



cinerea

**Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya
expresión se inducen *in planta* en la interacción
B. cinerea - tomate**

David Benito Pescador

Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias

Departamento de Microbiología y Genética



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
ÁREA DE GENÉTICA**

Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce *in planta* en la interacción *B. cinerea* - tomate

Memoria que presenta David Benito Pescador para optar al grado de Doctor

Salamanca, a 21 de Mayo de 2010

D. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Y

D. ARTURO PÉREZ ESLAVA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

AUTORIZAN

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada: “Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce *in planta* en la interacción *B. cinerea* - tomate”, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, que ha sido realizada por D. David Benito Pescador bajo nuestra dirección, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética.

En Salamanca, a 21 de Mayo de 2010

Fdo. Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo. Dr. D. Arturo Pérez Eslava

D. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Y

D. ARTURO PÉREZ ESLAVA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN

que D. David Benito Pescador ha realizado en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética el trabajo titulado: “Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce *in planta* en la interacción *B. cinerea* - tomate”, bajo nuestra dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca, a 21 de Mayo de 2010

Fdo. Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo. Dr. D. Arturo Pérez Eslava

**D. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICA

Que la memoria titulada: “Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce *in planta* en la interacción *B. cinerea* - tomate”, presentada por D. David Benito Pescador para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Ernesto Pérez Benito y D. Arturo Pérez Eslava, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Salamanca, a 21 de Mayo de 2010

Fdo. Dr. D. Ángel Domínguez Olavarri

Agradecimientos

Cuando Thomas Alva Edison (1847-1931) inventó la bombilla, no le salió a la primera, sino que realizó más de mil intentos, hasta el punto de que uno de los discípulos que colaboraba con él en el taller le preguntó si no se desanimaba ante tantos fracasos. A lo que Edison respondió:
"¿Fracasos? No sé de qué me hablas. En cada descubrimiento me enteré de un motivo por el cual una bombilla no funcionaba. Ahora ya sé mil maneras de no hacer una bombilla".

Gracias:

A mis padres, sin ellos ni existiría ni sería lo que soy. A ellos le debo este trabajo y mucho más.

A mi hermana Jessica y al resto de mi familia por estar ahí cuando siempre lo necesitaba.

A mis directores, Arturo que me dió la oportunidad de introducirme en el apasionante mundo de la investigación y a Ernesto que me dirigió este trabajo, y con su paciencia hacerme ver las cosas de una forma pausada y meditada.

A toda la gente del Laboratorio de Genética, desde los "mayores" (Maribel, Chema, Itu, Fernando...) hasta los estudiantes que pasaron fugazmente (Johanna, Margá...), sin olvidar a mis compañeros "genéticos" que tantas risas y alguna que otra pena hemos pasado juntos (Raúl, Raulito, Monica, Caty, Elvira, Brisa, Norman, Juan Luis, Choni, Jose Javier, Thais, Bea...).

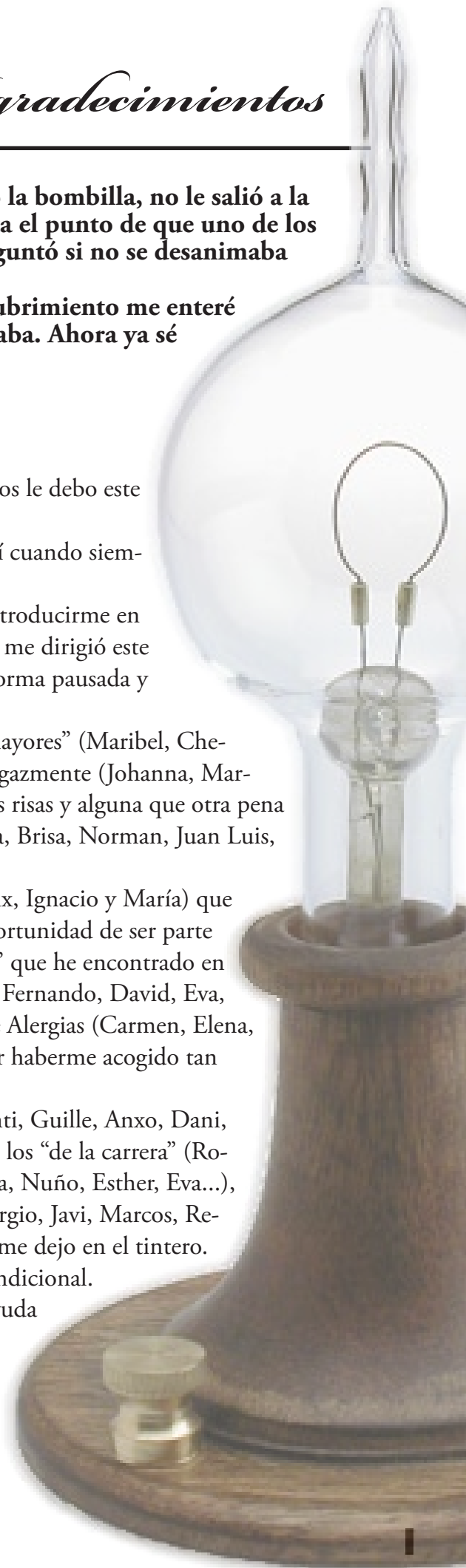
A mi nueva familia científica del Servicio de Alergias (Félix, Ignacio y María) que me han mostrado otro camino de la investigación y la oportunidad de ser parte de su grupo. Así como a los nuevos compañeros "clínicos" que he encontrado en esta nueva etapa (Arturo, Laura, Juana, Virginia, Marien, Fernando, David, Eva, Marta, María Luisa...) y a todo el personal del Servicio de Alergias (Carmen, Elena, Esther, Paco, Maite, MariAngeles, Juan, MariaJose...), por haberme acogido tan bien y hacerme sentir tan querido.

A todos mis amigos, tanto los "de toda la vida" (Paco, Santi, Guille, Anxo, Dani, Fernando, Jose, Lolo, Carlos, Boti, Pablo, Alex...) como a los "de la carrera" (Rodri, Nacho, Diego, Sebas, Meri, Elena, Toni, Chuchi, Sara, Nuño, Esther, Eva...), como a los que me he ido encontrando por el camino (Sergio, Javi, Marcos, Rebeca, Beatriz, Claudia, Anxo, Javier...) y tantos otros que me dejo en el tintero.

Y en especial a Maria, Elvira y Chedex por su apoyo incondicional.

Y por último, pero no menos importante, a Javi por su ayuda "gráfica y digital".

Gracias, a todos vosotros por ser esas "chispas" que me iluminaban cada vez que mis "bombillas" no eran capaz de dar luz.



“Llevas tanto tiempo en mi vida que no recuerdo nada más”

Ellen L. Ripley

ALIEN³



Índice de materias

<i>Índice de materias</i>	V
<i>Índice de figuras</i>	XI
<i>Simbolos y abreviaturas</i>	XIII
<i>Resumen.</i>	XV
<i>Introducción.</i>	1
1. Hongos fitopatógenos	3
1.1. Tipos de hongos fitopatógenos	
2. Interacción planta-patógeno	5
2.1. Respuesta de la planta	
2.2.a. Respuesta de Hipersensibilidad	
2.2.b. Resistencia Sistémica Adquirida	
2.3. El proceso de la infección	
2.3.a. Germinación de la espora y fase de penetración	
2.3.b. Fase de crecimiento	
2.2.c. Esporulación	
3. <i>Botrytis cinerea</i>	9
3.1. Sistemática y descripción	
3.2. Ciclo de vida	
3.3. Variabilidad genética	
3.4. Epidemiología y ciclo de la enfermedad	
3.5. Rango de hospedadores y sintomatología	
3.6. Estrategias de control	
3.6.a. Control químico	
3.6.b. Control biológico	
3.6.c. Prácticas culturales	
3.6.d. Mejora genética	
4. Interacción <i>B. cinerea</i> - huésped	23
4.1. Mecanismos de patogenicidad en <i>B. cinerea</i>	
4.1.a. Dispersión	

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- 4.1.b. Adhesión
- 4.1.c. Germinación
- 4.1.d. Penetración
- 4.1.e. Muerte celular
 - 4.1.e.1. Metabolitos de bajo peso molecular
 - 4.1.e.2. Choque oxidativo
 - 4.1.e.3. Ácido oxálico
 - 4.1.e.4. Proteínas tóxicas
- 4.2. La infección requiere de una participación activa del huésped
- 4.3. Evasión de los mecanismos de defensa de la planta
- 4.4. Mecanismos de señalización durante la infección
 - 4.4.a. Ruta de señalización dependiente de AMPc
 - 4.4.b. Ruta de señalización controlada por la MAP quinasa
 - 4.4.c. Ruta de señalización dependiente de Ca²⁺/calmodulina
 - 4.4.d. Ruta de señalización de las proteínas GTPasas
- 4.5.e. Sensores y receptores

5. Estrategias experimentales para el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad en *B. cinerea*. **33**

- 5.1. Análisis por inactivación génica en *B. cinerea*
 - 5.1.a. Mutagénesis dirigida por disrupción génica
 - 5.1.b. Mutagénesis dirigida por reemplazamiento génico
 - 5.1.c. Mutagénesis aleatoria por inserciones de T-DNA
 - 5.1.d. Silenciamiento génico por ARN de interferencia
- 5.2. Métodos indirectos de análisis de la función génica en *B. cinerea*
- 5.3. Análisis y caracterización funcional de genes expresados diferencialmente *in planta*.
 - 5.3.a. Expresión diferencial mediante DDRT-PCR
 - 5.3.b. Señales detectadas y genes expresados en la interacción *B. cinerea*-tomate
 - 5.3.b.1. Fragmento ddB-2
 - 5.3.b.2. Fragmento ddB-47

Objetivos **43**

Materiales y Métodos **47**

6. Organismos **49**

- 6.1. Plantas

6.2. Hongos	
6.3. Bacterias	
6.4. Virus	
7. Medios y condiciones de cultivo	51
7.1. Plantas	
7.2. Hongos	
7.2.a. Cultivo en medio líquido de <i>B. cinerea</i>	
7.2.b. Cultivo en medio sólido de <i>B. cinerea</i>	
7.3. Bacterias	
7.4. Bacteriófagos	
8. Manipulación de <i>B. cinerea</i>	55
8.1. Recolección de conidios de <i>B. cinerea</i>	
8.2. Conservación de aislados	
8.3. Obtención de cultivos monospóricos	
9. Estudio del fenotipo en <i>B. cinerea</i>	57
9.1. Ensayos de crecimiento saprofito	
9.2. Ensayos de infección en planta	
9.2.a. Caracterización fitopatológica	
9.2.b. Obtención de material infectado para la extracción de DNA y RNA	
9.3. Estudios de microscopía	
9.3.a. Microscopía óptica	
9.3.b. Microscopía confocal	
9.3.c. Tinciones	
10. Herramientas y procedimientos moleculares	61
10.1. Extracción de ácidos nucleicos	
10.1.a. DNA genómico de <i>B. cinerea</i>	
10.1.a.1. Método estándar	
10.1.a.2. Método rápido	
10.1.b. ADN plasmídico	
10.1.b.1. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	
10.1.b.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico	
10.1.b.3. Utilización de un kit comercial para la purificación de ADN plasmídico	
10.1.c. ADN de bacteriófagos	
10.1.d. Extracción de ARN total de <i>B. cinerea</i>	
10.2. Vectores de clonación	
10.2.a. pGEM-T y PGEM-T easy	
10.2.b. pBlueScript II SK +/-	

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

10.2.c. pOHT	
10.2.d. EMBL3	
10.3. Tratamientos enzimáticos del ADN	
10.3.a. Enzimas de restricción	
10.3.b. Defosforilación	
10.3.c. Ligaciones	
10.4. Electroforesis	
10.4.a. Electroforesis de DNA	
10.4.b. Electroforesis de RNA	
10.5. Recuperación de fragmentos de DNA	
10.6. Transformaciones	
10.6.a. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	
10.6.b. Transformación de <i>E. coli</i>	
10.6.c. Transformación de <i>B. cinerea</i>	
10.7. Genoteca de ADN genómico	
10.8. Amplificación de DNA por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	
10.8.a. PCR Estándar	
10.8.b. RT-PCR	
10.9. Hibridaciones	
10.9.a. Marcaje de sondas	
10.9.b. Southern	
10.9.c. Northern	
10.10. Secuenciación	
11. Análisis y presentación de datos	81
<i>Resultados</i>	79
12. El gen Bde47	81
12.1. Hibridaciones	
12.2. Análisis de la expresión génica	
12.3. Aislamiento del gen Bde47A	
12.4. Análisis de la secuencia del gen Bde47A	
12.4.a. La región estructural	
12.4.b. Análisis de la región promotora	
12.4.c. Análisis de la región 3' flanqueante	
12.4.d. La proteína deducida	
13. Localización subcelular de la proteína BCMIMP1	105

13.1. Obtención de transformantes con GFP	
14.2. Análisis del transformante GMAS7	
14. Análisis funcional del gen <i>Bcmimp1</i>	115
14.1. Obtención de mutantes deficientes en el gen <i>Bcmimp1</i>	
14.1.a. Construcción del plásmido p47-13 y transformación de <i>B. cinerea</i> .	
14.1.b. Análisis de los transformantes e identificación de candidatos	
14.2. Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta Bcmimp1$	
14.2.a. Análisis de comportamiento durante el crecimiento saprofitico	
14.2.b. Análisis de comportamiento “in planta” (virulencia)	
14.2.b.1. Inoculaciones.	
14.2.b.2. Análisis de la capacidad de penetración	
14.2.b.3. Análisis de la agresividad sobre la planta huésped	
15. Estrategias para la identificación del gen Bde47B	131
15.1. Hibridación en condiciones moderadamente restrictivas.	
15.2. Análisis bioinformático	
16. El fragmento ddB2 y el gen Bde2	147
16.1. Análisis de la expresión génica	
16.2. El gen codificador	
16.3. Estrategia de clonación y secuenciación del gen Bde2.	
16.4. Secuencia del gen Bde2	
16.5. Análisis de la región promotora	
16.6. La región 3' flanqueante	
16.7. La proteína deducida	
17. Análisis funcional del gen Bde2	165
17.1. Diseño Experimental	
17.2. Construcción de los plásmidos utilizados	
17.3. Transformación de la cepa B05.10 de <i>B. cinerea</i> .	
17.4. Selección de candidatos mediante PCR	
17.5. Purificación de cultivos monospóricos	
<i>Discusión.</i>	173
18. Elección de metodologías	177
19. Los genes derivados del cDNA ddB47	179
19.1. El gen <i>Bcmimp1</i>	
19.2. El gen <i>Bcmimp1</i> y su relación en el metabolismo mitocondrial.	
19.3. La proteína BCMIMP1 en la mitocondria	

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

19.4. Papel del gen <i>Bcmimp1</i> durante la interacción <i>B. cinerea</i> -tomate.	
19.5 El gen Bde47B	
20. El gen derivado del cDNA ddB2	195
20.1. El gen Bde2	
20.2. Ciclinas reguladoras de la transcripción	
20.3. Ciclinas de tipo C	
20.4. Ciclinas de tipo K	
20.5. Las ciclinas de tipo C y la respuesta al estrés oxidativo	
21. Consideraciones finales	205
 <i>Conclusiones</i>	 209
 <i>Bibliografía.</i>	 215

Índice de figuras

- Figura 2.1 Espora de *B. cinerea* germinando.
Figura 3.1 Conidioforos de *B. cinerea*.
Figura 3.2 Análisis filogenético de *Botrytis* spp.
Figura 3.3 Ciclo de vida de *B. cinerea*.
Figura 3.4 Estructura química de varios compuestos activos sobre *Botrytis* spp.
Figura 5.1 Gel de un análisis mediante DDRT-PCR.
Figura 5.2 Gel de DDRT-PCR del fragmento ddB2.
Figura 5.3 Gel de DDRT-PCR del fragmento ddB47.
Figura 8.1 Extracción de conidios de *B. cinerea*.
Figura 9.1 Sistema de infección en hojas de tomate.
Figura 10.1 Plásmidos pGEM-T y pGEM-T easy.
Figura 10.2 Plásmido pBlueScriptII.
Figura 10.3 Plásmido pOHT.
Figura 12.1 Análisis y cuantificación de los patrones de expresión durante la interacción *B. cinerea*-tomate.
Figura 12.2 Southern de *B. cinerea*.
Figura 12.3 Hibridación en condiciones de alta astringencia de una genoteca de fagos
Figura 12.4 Hibridación en condiciones de baja astringencia de una genoteca de fagos
Figura 12.5 Mapa de restricción de la región genómica de Bde47A y análisis northern con diversas sondas.
Figura 12.6 Alineamiento del fragmento de cDNA ddB47 en secuencia clonada.
Figura 12.7 Secuencia de nucleótidos de la región genómica de Bde47A
Figura 12.8 Esquema de la posible localización de los dominios transmembranales de BDE47A
Figura 12.9 Perfil de hidrofobicidad de BDE47A
Figura 12.10 Representación gráfica de la organización y ubicación de BCMIMP1
Figura 12.11 Alineamiento de la secuencia de BCMIMP1 con secuencias homologas de hongos
Figura 12.12 Alineamiento de BCMIMP1 con secuencias de bacterias algas y hongos.
Figura 13.1 Construcción de pMAS25
Figura 13.2 Mapas de restricción del alelo silvestre de Bde47 y del alelo fusión Bde47+GFP
Figura 13.3 Southern de transformantes pMAS
Figura 13.4 Comprobación mediante PCR del transformante GMAS7
Figura 13.5 Comparación del patrón de expresión del alelo silvestre Bde47A con el alelo fusión Bde47A+GFP
Figura 13.6 Imágenes por microscopia confocal de *B. cinerea*
Figura 14.1 Construcción del plásmido p47-13
Figura 14.2 Región genómica de Bde47A y del mutante por reemplazamiento génico
Figura 14.3 Análisis mediante PCR de transformantes p47-13
Figura 14.5 Hibridaciones de los mutantes 47-13 elegidos con distintas sondas.
Figura 14.6 Gráficas del crecimiento saprofito de los mutantes p47-13
Figura 15.1 Hibridación del DNA de fagos con la sonda ddB47

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Figura 15.2 Secuencia de la región terminal y 3' de Bde47A y fragmento de cDNA ddb47
- Figura 15.3 Contenido G+C y A+G en distintas regiones del gen Bde47A
- Figura 15.4 Alineamiento BLASTN de los clones de la genoteca de DNA con ddb47
- Figura 15.5 Ensamblaje manual de la secuencia 2080 (B)
- Figura 15.6 Representación gráfica de las secuencias anotadas manualmente.
- Figura 15.7 Hibridaciones northern con sondas derivadas de fragmentos seleccionados
- Figura 16.1 Análisis y cuantificación de los patrones de expresión durante la interacción *B. cinerea*-tomate.
- Figura 16.2 Hibridación Southern con la sonda ddb2
- Figura 16.3 Hibridación en condiciones de alta astringencia de una genoteca de fagos
- Figura 16.4 Hibridación Southern de filtro con DNA de fagos con la sonda ddb2
- Figura 16.5 Esquema del plásmido p2-1 y de la región genómica del gen Bde2
- Figura 16.6 Hibridaciones con sondas p2-2 y p 2-3
- Figura 16.7 Región genómica del gen Bde2 detectada por la sonda ddb2
- Figura 16.8 Secuencia que incluye el gen Bde2 del genoma de *B. cinerea*
- Figura 16.9 Alineamiento local de la región genómica de Bde2 y fragmento ddb2
- Figura 16.10 Comparación del gen Bde2 con secuencias de genes ortólogos
- Figura 16.11 Secuencia de la region genómica de Bde2
- Figura 16.12 Secuencia proteica de BCTC1 con posibles dominios conservados
- Figura 16.13 Análisis filogenético de Bde2 con cilcinas de tipo C y K
- Figura 17.1 Construcción del pBPC5
- Figura 17.2 Organización del locus de Bde2 y del mutante por reemplazamiento
- Figura 17.3 Análisis por PCR de transformantes primarios con pBPC5
- Figura 17.4 Análisis por PCR de cultivos monospóricos

Figuras 8.1 y 9.1 cortesía de J.L.T.G.

Simbolos y abreviaturas

A	Adenina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
C	Citosina
CAK	Ciclina activadora de CDK
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
cDNA	ADN complementario
CDP-Star	(2-Cloro-5-(4-metoxipiro(1,2-dioxietano-3,2'-(5'cloro)triciclo[3.3.1.1.3.7]decan)-4il)-1-fenilfosfato disódico)
CTD	Dominio Carboxi-Terminal
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
dUTP	2'-deoxiuridina 5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DIG	Digoxigenina-11-desoxiuridina-5'-trifosfato
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> , y colaboradores
g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad
G	Guanidina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente
hpi	Horas post infección
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases (1000 pares de bases)
kDa	kilodaltons
Kg	Kilogramo
l	Litro
m	Metro
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> , proteínas activadas por mitógeno
Mb	Megabases (1000 kilobases, 1.000.000 pares de bases)
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ml	Mililitro
mRNA	ARN mensajero
MOPS	Ácido-3-morfolinopropanosulfónico
N	Normal
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
nt	nucleótidos

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pA	Picoamperios
pb	Pares de bases
pg	Picogramos
pmol	Picomoles
PMSF	Fenil metano sulfonilo fluorida
RH	Respuesta de hipersensibilidad
RNA	Ácido ribonucleico
RNApolII	RNA polimerasa II
RNAse	Ribonucleasa
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
rRNA	ARN ribosómico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase-PCR</i> , transcripción inversa
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i> , resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecilsulfato Sódico
T	Timina
TAE	Tris acético EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etileno diamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracilo
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
V	Voltio
vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactósido

CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS (IUPAC)

Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Aspartato	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q	Serina	Ser	S
Glutamato	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno causante de la podredumbre gris y considerado como uno de los principales microorganismos responsables del deterioro de frutas y hortalizas durante su cultivo y en postcosecha y, por tanto, responsable de grandes pérdidas económicas. Es un patógeno generalista que puede atacar especies de la mayoría de las familias de dicotiledóneas. *B. cinerea* es un hongo necrotrofo que requiere la muerte de las células vegetales para poder alimentarse y desarrollar la infección. Sin embargo, los mecanismos que participan en estos procesos aún no han sido esclarecidos en su totalidad.

Con el objeto de contribuir a la caracterización de los mecanismos de patogenicidad de *B. cinerea*, se procedió a llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial durante la interacción *B. cinerea* – tomate (Benito *et al.* 1996) para tratar de identificar genes cuya expresión se inducía, o aumentaba significativamente, durante la interacción del patógeno con su huésped. Esta aproximación se basa en la consideración de que la inducción de la expresión de un gen en unas condiciones dadas o en un proceso particular nos permite presuponer que dicho gen y su producto génico juegan un papel importante en el proceso analizado o son necesarios para la adaptación del organismo a las condiciones concretas estudiadas. Fruto de la aproximación experimental aplicada se aislaron varios fragmentos de cDNA derivados de genes cuya expresión se inducía, o aumentaba significativamente, *in planta*, lo que hace suponer que los genes correspondientes están implicados en el proceso de infección. Esta tesis aborda la caracterización de dos de estos fragmentos de cDNA.

El fragmento de cDNA ddB47 hibrida con dos RNA mensajeros de distinto tamaño que derivan de la transcripción de dos genes distintos que muestran similitud en su secuencia en parte de la región codificante. El primer gen, Bde47A, más tarde renombrado *Bcmimp1*, codifica el RNA mensajero de mayor tamaño de los dos RNA detectados mediante hibridación con el fragmento ddB47. La expresión de *Bcmimp1* está regulada tanto durante el crecimiento saprofítico como durante la interacción con el huésped. Durante el crecimiento saprofítico la expresión es mayor durante la fase de germinación de las esporas y de emisión de los tubos germinativos, decayendo posteriormente, durante la producción de extensión y ramificación de micelio maduro. *In planta*, *Bcmimp1* muestra un patrón de expresión transitoria, alcanzando su expresión niveles máximos durante las fases de penetración, de expansión de las lesiones dispersivas y de colonización y maceración del tejido infectado. El análisis de la secuencia de la proteína deducida indica que BCMIMP1 es una proteína de membrana, localizada en la membrana interna mitocondrial, con una función estructural. Mediante experimentos de colocalización llevados a cabo con una proteína fusión BCMIMP1-GFP se ha

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

podido comprobar que, efectivamente, se trate de una proteína mitocondrial. El fenotipo molecular de los transformantes que expresan la proteína fusión sugiere que el extremo carboxilo es esencial para la función de la misma.

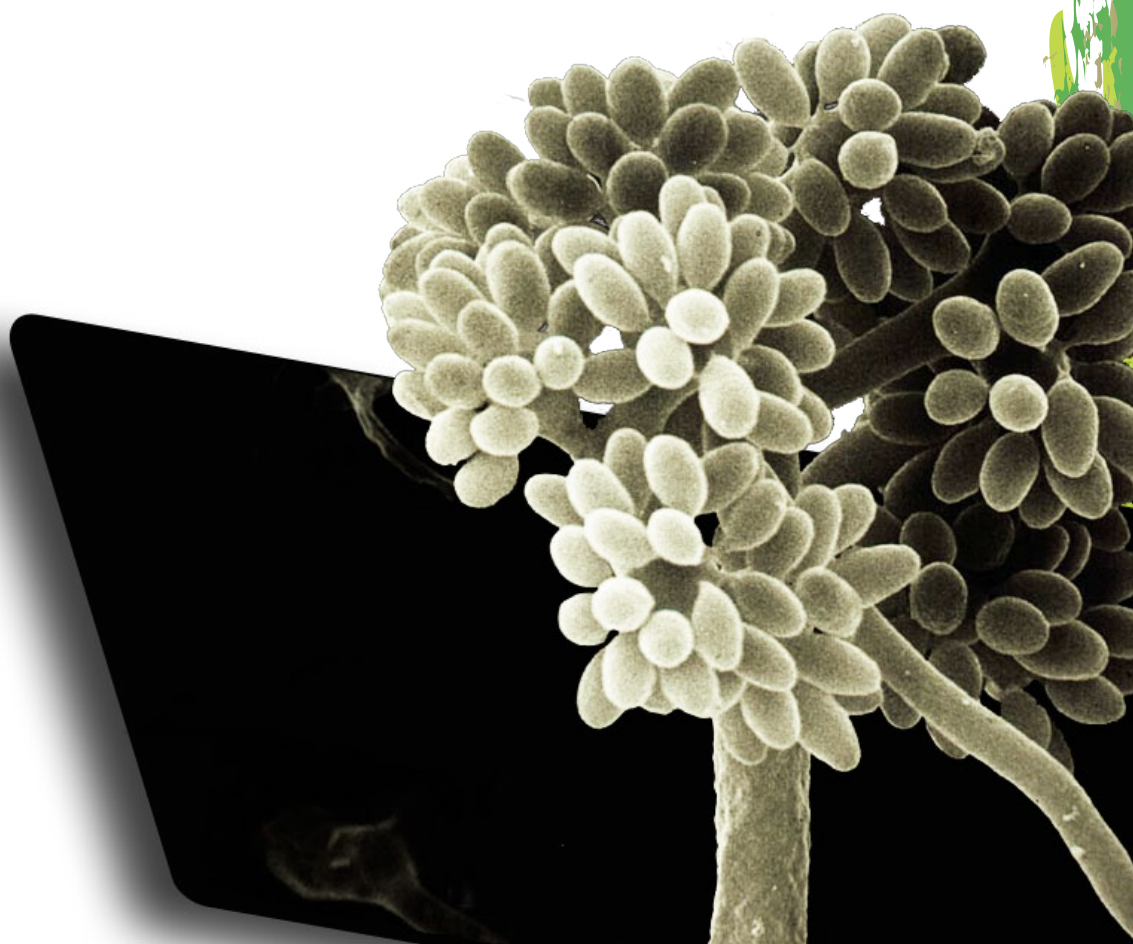
Se han obtenido mutantes $\Delta Bcmimp1$ mediante reemplazamiento génico. Estos mutantes no muestran diferencias fenotípicas durante el crecimiento saprofítico de *B. cinerea*. Sin embargo, sí muestran un aumento de su agresividad sobre tomate en relación con la cepa tipo silvestre. Teniendo en cuenta estas observaciones es posible argumentar que la proteína BCMIMP1 es necesaria para un correcto comportamiento y funcionamiento del metabolismo mitocondrial probablemente como consecuencia del papel estructural que desempeña y que su eliminación conduce a una desorganización de la membrana mitocondrial que, sorprendentemente no determina alteraciones fenotípicas durante el crecimiento saprofítico pero sí durante la interacción con el huésped.

Se ha intentado clonar el gen Bde47B, codificador del mensajero de menor tamaño de los dos RNA mensajeros detectados mediante hibridación con el fragmento ddB47, pero las dos aproximaciones experimentales aplicadas han resultado infructuosas.

El gen *Bctc1* es el gen cuya transcripción origina el RNA mensajero a partir del cual deriva el fragmento de cDNA ddB2. Su expresión sólo se detecta durante la interacción del patógeno con su planta huésped, concretamente durante la fase colonización y maceración del tejido infectado. El estudio de la secuencia deducida de la proteína BCTC1 permitió identificarla como una ciclina relacionada con transcripción. A pesar de los numerosos intentos llevados a cabo y del elevado número de transformantes obtenidos con una construcción diseñada para el reemplazamiento génico y analizados, no ha resultado posible obtener mutantes $\Delta Bctc1$, lo que nos permite concluir que la mutación es letal y que, por lo tanto, que el gen es esencial.

Tomadas en conjunto, las observaciones derivadas del análisis de expresión y del análisis funcional de los genes *Bcmimp1* y *Bctc1* llevados a cabo sugieren que la adaptación del patógeno a una situación de interacción con el huésped determina la modulación por una parte, de la actividad mitocondrial en las distintas fases del proceso de infección y, por otra, de la transcripción de una proteína tipo ciclina probablemente implicada en el control de la transcripción de otros genes.

Introducción



1. Hongos fitopatógenos

Los hongos son organismos eucariotas relacionados con los metazoos y su reino engloba alrededor de un millón y medio de especies, tan diversas como levaduras unicelulares, patógenos de plantas y animales, o simbioses de la raíz vegetal. La mayoría de los hongos son organismos multicelulares filamentosos, aunque también podemos encontrar levaduras unicelulares.

Para satisfacer sus necesidades de nutrientes orgánicos, la mayoría de las especies de hongos tienen un estilo de vida saprofito. Sin embargo, una minoría ha adquirido la capacidad de desarrollarse sobre plantas vivas, y a menudo causan enfermedades al hospedador. Desde un punto de vista funcional, los hongos patógenos de plantas o fitopatógenos constituyen un grupo relevante, que engloba tanto hongos inferiores como hongos superiores. Estos hongos fitopatógenos son el resultado de la evolución de mecanismos que permitieron la transición de hongos saprófitos, que se nutren de materia orgánica muerta, a hongos patógenos que adaptaron su desarrollo al ciclo de vida de sus hospedadores.

1.1. Tipos de hongos fitopatógenos

Los hongos patógenos de plantas han sido tradicionalmente clasificados atendiendo a su estilo de vida en dos tipos: biotrofos y necrotrofos.

Los patógenos biotrofos (*Puccinia graminis*, *Passalora fulva*, *Ustilago maydis*) presentan una dependencia total con el hospedador para completar su ciclo de vida, obteniendo nutrientes a partir de las células vivas mediante el desarrollo de estructuras de infección especializadas (Marshall y Grana, 2006) como el apresorio (*Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum* spp.), el haustorio (*Erysiphe graminis*) y el rizoide (*Rhizopus* spp.). Este tipo de patógenos normalmente presentan unas interacciones biológicas sofisticadas con su hospedador vegetal, resultantes de una co-evolución (de Meaux y Mitchell-Olds, 2003).

Por otro lado, los patógenos necrotrofos (*Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Cochliobolus heterostrophus*) se consideraron, equivocadamente, como unos invasores con mecanismos poco sofisticados, sin estructuras de infección especializadas y que carecían de una interacción “real” con su hospedador (Lewis, 1973). Actualmente, se ha demostrado que poseen mecanismos sutiles para subyugar a la planta huésped de la que se van a alimentar, matando a las células huésped mediante el uso de moléculas tóxicas y enzimas líticas para, a continuación, descomponer los tejidos vegetales, consumirlos y aprovecharlos para aumentar su biomasa y poder crecer.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Un tercer tipo, acuñado recientemente, son los hongos hemibiotrofos. Estos hongos hemibiotrofos son patógenos que presentan una fase de biotrofo, durante la cual penetran dentro de la planta y se establecen dentro del tejido del hospedador, para después pasar a una forma de vida necrotrofa (Mendgen y Hahn, 2002; Perfect y Green, 2001), como en el caso de *Fusarium oxysporum*, *M. grisea* (T.T. Hebert) *Colletotrichum* spp o *P. infectans*.

Otras clasificaciones consideran otras características biológicas, como que los patógenos requieran de manera obligatoria o facultativa un hospedador para su desarrollo. En este caso podemos hablar de parásitos obligados (aquellos que requieren de manera obligada un hospedador y adoptan una forma de resistencia), saprófitos oportunistas o facultativos (cuando pueden vivir de forma saprofítica hasta que encuentran un hospedador) o parásitos oportunistas o facultativos (cuando aprovechan los recursos nutricionales de plantas debilitadas).

Los patógenos pueden penetrar en la planta por la zona aérea o a través de las raíces de la planta, denominándose aéreos o air-borne (*B. cinerea*, *Colletotrichum* spp.) o de suelo (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp.). Dependiendo de la zona de la planta en la que desarrollen su ciclo vital tenemos patógenos radiculares, vasculares, foliares, de frutos o de flores.

Dependiendo de si presentan especificidad alta o baja con el hospedador tenemos patógenos monófagos, que presentan alta especificidad por un tipo concreto de hospedador (*Alternaria alternata*, *F. oxysporum*), y polífagos, que tienen baja especificidad y por tanto un amplio rango de hospedadores (*Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.).

B. cinerea se considera como:

Botrytis cinerea

- Necrotrofo facultativo
- Aéreo
- Sistémico (ataca a toda la planta)
- Ubicuo

2. Interacción planta-patógeno

Las plantas están bajo un constante ataque por los patógenos, y para impedirlo han desarrollado amplios mecanismos de defensa específicos contra los patógenos y éstos, por su parte, han evolucionado para superar las defensas del hospedador.

A lo largo del tiempo se ha intentado luchar contra este tipo de patógenos empleando distintos métodos, como la utilización de compuestos químicos, con las desventajas para el ambiente y la salud pública que ello supone, métodos de control biológico (por competencia, producción de antibióticos, micoparasitismo y depredación) y, sobre todo, la mejora genética de la planta con el desarrollo de cultivares de resistencia, que ha sido el método más ventajoso a largo plazo. Para combatir a los patógenos es necesario conocer los mecanismos que obran en la interacción planta-patógeno.

La interacción puede ser compatible (virulenta) cuando las condiciones son favorables para el patógeno, de forma que éste puede quebrar los mecanismos de defensa de la planta resultando un éxito en el proceso de infección, o por el contrario, incompatible (avirulenta) cuando la infección no progresa y los mecanismos de defensa de la planta impiden la entrada o el establecimiento del patógeno. Esta resistencia a un patógeno específico, que puede ser heredable bajo un modelo mendeliano de dominancia, ha dado lugar al modelo “gen a gen” (Flor, 1956).

En otros casos la resistencia obedece a un patrón multigénico. Así, para patógenos cuya virulencia radica en la producción de toxinas, la compatibilidad o incompatibilidad depende no solo del reconocimiento del factor de virulencia, sino de la producción de la toxina determinada por un gen dominante (Tox) del patógeno y la existencia de genes dominantes que determinan la producción de sistemas enzimáticos de desintoxicación en la planta (Dangl y Jones, 2001).

En este grupo encontramos a los hongos necrotrofos, capaces de matar a las células huésped por medio de moléculas y enzimas líticas para, a continuación, descomponer el tejido de la planta atacada y consumirla para su propio crecimiento. En el caso de que las moléculas tóxicas sean activas para una o un número pequeño de especies vegetales, el patógeno tiene un rango de hospedador limitado y el metabolito se denomina toxina selectiva de huésped (Host-Selective Toxin) (Wolpert *et al.*, 2002), como en el caso de *Cochliobolus* y *Alternaria* spp. Por el contrario, si el hongo necrotrofo produce una amplia batería de toxinas y enzimas, hablamos de patógenos con un amplio rango de hospedador, como es el caso del orden Moniliales, que incluye a *S. sclerotiorum* (conocido como podredumbre blanca) y a *B. cinerea* (conocido como podredumbre gris).

2.1. Respuesta de la planta

En las plantas que actúan de hospedador se han descrito mecanismos de defensa tanto preexistentes como inducibles por el ataque del patógeno. Cuando el patógeno se dispone a penetrar en la planta, la primera defensa que se encuentra por parte de ésta es la pared celular. Una vez que son atacadas, las plantas inducen una serie de respuestas para activar rápidamente sus defensas en el sitio donde se produjo la infección y crear en la zona un ambiente hostil para el desarrollo del patógeno. Esta respuesta de la planta implica la activación de numerosos mecanismos: genes de defensa, canales iónicos, modificación de proteínas o activación enzimática que modifique los metabolismos primario y secundario, además de generar señales secundarias para coordinar la respuesta.

Primero, la planta forma estructuras de resistencia en la pared celular para bloquear físicamente el avance del hongo, como papilas de callosa y lignina, o sintetiza glicoproteínas de pared ricas en hidroxiprolina y proteínas inhibidoras de poligalacturonasas, para impedir la rotura de pectinas. Asimismo, la planta dispone de un amplio arsenal de compuestos antimicrobianos de amplio espectro, como las fitoalexinas, cuya producción se ha demostrado ligada a la infección (Thomma *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004), o compuestos fenólicos, azufrados, glicósidos fenólicos, lactonas insaturadas, dienos y un largo etcétera (Prusky y Keen, 1993).

2.2.a. Respuesta de Hipersensibilidad

La activación de estos mecanismos de forma rápida conduce en pocas horas a la muerte de las células y tejidos atacados. Este proceso de muerte celular programada se conoce como Respuesta de Hipersensibilidad (RH) (Wei *et al.*, 1992). Existen dos posibles mecanismos para activar la RH: por activación del programa de muerte celular una vez detectado el patógeno o por necrosis producida bien por sustancias tóxicas del patógeno o bien por la liberación de toxinas por la propia planta. La RH no es un mecanismo que ocurra en todas las reacciones de defensa, pues existen genes R que no confieren resistencia mediada por RH.

Además de la muerte por RH, la planta presenta otro tipo de mecanismos defensivos, como reforzar las paredes celulares con depósitos de calosa en la zona próxima al ataque de los patógenos (Kudlicka y Brown Jr, 1997). Se ha descrito que mutantes de plantas inmunodeficientes no forman depósitos de calosa, por lo que se deduce su relación con la defensa de las plantas (Donofrio y Delaney, 2001). Si la pared celular se daña por la lucha planta-patógeno y el patógeno entra dentro de la planta, ésta dispone de un arsenal de compuestos antimicrobianos de amplio espectro para combatir a los atacantes como las fitoalexinas, estando su producción ligada a la infección (Thomma *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004).

Por otro lado, el desarrollo de las plantas y su respuesta al ambiente está fuertemente regulado por hormonas. Esta característica no ha sido pasada por alto por los hongos patógenos y existen

patógenos que son capaces de producir hormonas de la planta para crear un ambiente apropiado para el desarrollo del patógeno (Tudzynski, 2005), como la biosíntesis de giberelina por *Fusarium* spp. o la producción de etileno, aunque no está claro si el etileno producido *in planta* por el patógeno resulta beneficioso para su desarrollo o actúa como un factor de virulencia interfiriendo con el etileno producido por la planta, que es necesario para la defensa (Guo y Ecker, 2004).

Otros tipos de respuestas son: la producción de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species), un grupo de moléculas especialmente oxidativas que incluye el radical hidroxilo, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, que se detectan en pocos minutos en la mayoría de reacciones incompatibles; la producción de óxido nítrico (NO), que inhibe catalasas y ascorbato peroxidasa, potenciando el aumento de ROS e induciendo la muerte celular por daño oxidativo. También se producen señales secundarias, como son el ácido benzoico, jasmonato, alicilato o etileno, implicadas en la activación de genes de resistencia local y sistémica.

2.2.b. Resistencia Sistémica Adquirida

Paralelamente a la RH, las plantas pueden tener un sistema de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, systemic acquired resintence) (Hutcheson, 1998), que avisa de la presencia del estrés en otras zonas de la planta que no han sufrido el ataque del patógeno. Se induce respuesta de defensa local en pocos minutos que puede transmitirse a tejidos vecinos e incluso a otras plantas. El tipo de respuesta está determinada por el tipo de patógeno. Muchos hongos, al igual que virus y bacterias, activan la SAR a través del salicilato y del metil-salicilato, lo que reducirá la capacidad de infección de estos patógenos en ataques posteriores.

2.3. El proceso de la infección

El proceso de la infección del patógeno puede considerarse dividido en fases: germinación, proliferación y esporulación (Solomon *et al.*, 2003). Esta división puede utilizarse para seguir los cambios nutricionales del patógeno en el contexto de la infección (Divon y Fluhr, 2007).

2.3.a. Germinación de la espora y fase de penetración

La penetración del patógeno en su hospedador se facilita por la presión local ejercida durante el desarrollo del apresorio, la digestión enzimática de las barreras de la planta o mediante la disponibilidad de estomas abiertos o heridas en la superficie de la planta. Se asume que durante la germinación de la espora y la fase de penetración, los hongos fitopatógenos están en un estado de ayuno y dependen de sus reservas internas para obtener nutrientes. Los principales componentes de estas reservas incluyen glicógeno, trehalosa, polialcoholes y lípidos (Thevelein, 1984; Thines *et al.*, 2000; Voegele

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador



Figura 2.1
Esporas de *B. cinerea*
germinando

et al., 2005). Recientemente se ha estudiado la movilización de los ácidos grasos durante el proceso de penetración en varios sistemas planta-patógeno (Divon y Fluhr, 2007; Güldener *et al.*, 2006; Jakupovic *et al.*, 2006).

2.3.b. Fase de crecimiento

Una vez dentro del hospedador, con las reservas energéticas agotadas, el patógeno necesita recuperarse rápidamente, movilizándolo los mecanismos que le proporcionen nutrientes de la planta. Los procedimientos seguidos por el hongo dependen de su necesidad de mantener con vida las células del hospedador.

Para los biotrofos obligados, esta fase se inicia con la formación de los haustorios (Voegelé, 2006). Los hemibiotrofos que carecen de estructuras especializadas, han desarrollado mecanismos que les permiten el acceso al metabolismo del hospedador. La inducción de invertasas extracelulares de la planta como respuesta a diferentes estímulos bióticos o abióticos, sirven de entrada de nutrientes a la planta que le proporcionarán energía para defenderse de los patógenos (Biemelt y Sonnewald, 2006). Sin embargo, algunos patógenos aprovechan esta respuesta fisiológica de la planta para la toma de carbohidratos para su propio uso (Fotopoulos *et al.*, 2003). Al igual que ocurre con la toma de carbohidratos de la planta durante la infección, la adquisición de nitrógeno por parte del patógeno en ocasiones es debida a la producción de la planta de diferentes compuestos para defenderse del patógeno.

En cambio, poco después de la penetración, los patógenos necrotrofos, ayudados por la producción de toxinas, enzimas hidrolíticas, etc., causan lisis celular y muerte de las células hospedadoras. Este proceso incrementará la cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento del patógeno y por tanto la conversión de tejido muerto del hospedador en biomasa del hongo, aunque haya ciertos compuestos que el hongo debe sintetizar (Güldener *et al.*, 2006; Seong *et al.*, 2005).

2.2.c. Esporulación

La esporulación marca el final del ciclo de vida del patógeno. En hongos biotrofos verdaderos, el ciclo de vida se completa manteniéndose el estado biotrófico, mientras que los hemibiotrofos y necrotrofos completan su ciclo de vida en un estado necrotrófico. Estudios *in vitro* han mostrado que la esporulación puede desencadenarse por la carestía de las fuentes de carbono y nitrógeno (Griffin, 1996).

3. *Botrytis cinerea*

Desde la antigüedad, el moho o podredumbre gris es una enfermedad bien conocida por el hombre, ya descrita por Plinio el viejo en el siglo primero de nuestra era. Pero, hasta el siglo XVI no tendremos una descripción del agente causante de la enfermedad: el género *Botrytis*.

Este género, junto a otros de la familia Sclerotiniaceae, está entre los géneros más antiguos de patógenos de plantas y fue descrito por primera vez en 1729 por Michaeli y relacionado con la podredumbre gris por Smith, en 1900 (Smith, 1900). Más tarde (bajo el sistema binomial de Linneo) Persoon describió 5 especies, entre las cuales incluyó una de las especies descritas por Michaeli, *B. cinerea*. La relación con su teleomorfo *Botrytium* spp. fue establecida a mediados del siglo XX (Groves y Loveland, 1953) y el género *Botrytis* fue redefinido por Hennebert (Hennebert 1973), comprendiendo hoy en día 22 especies.

La mayoría de las especies de *Botrytis* tienen un estrecho margen de hospedadores, como, por ejemplo, *B. aclada* cuyo hospedador es *Allium* spp. o *B. fabae* que tiene como hospedadores a las leguminosas. *B. cinerea*, por su parte, es un hongo patógeno capaz de infectar al menos a 235 especies vegetales distintas (Jarvis, 1977), tanto en regiones templadas como en regiones subtropicales de todo el mundo. Especies agrícolas importantes, tales como vid, tomate, fresa, pepino, además de plantas ornamentales y productos agrícolas almacenados y transportados son atacadas por este patógeno, haciendo de *B. cinerea* un patógeno ubicuo con un amplio rango de hospedadores causante de importantes pérdidas económicas antes y después de la recolección. *B. cinerea* puede atacar en cualquier estadio de desarrollo del cultivo, así como infectar cualquier órgano de la planta, incluyendo flores, frutos, hojas, brotes y tubérculos.

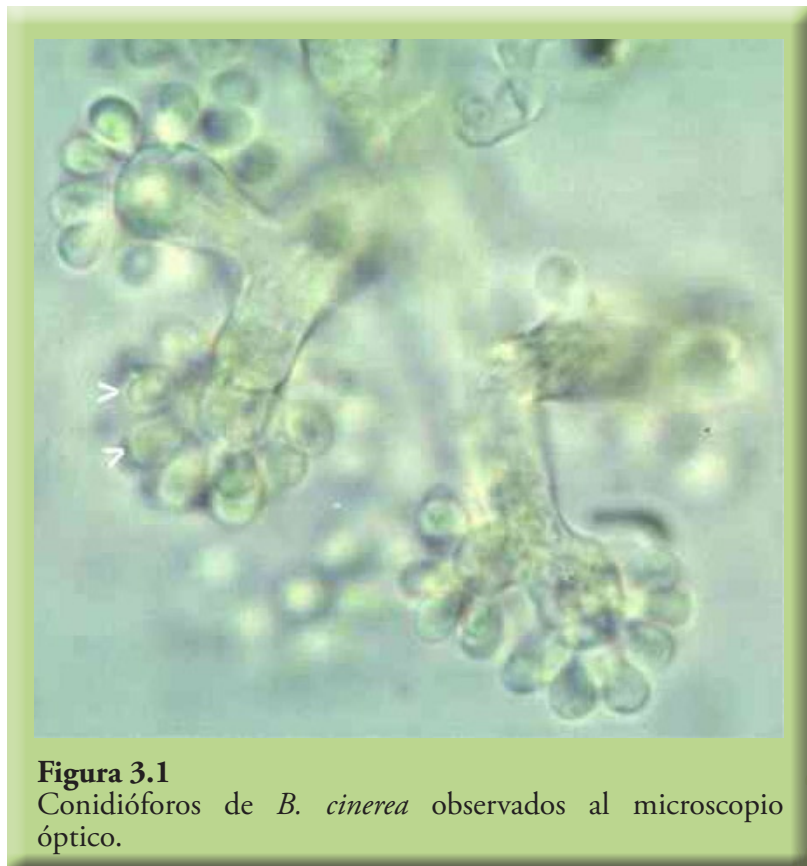


Figura 3.1
Conidióforos de *B. cinerea* observados al microscopio óptico.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Aunque es especialmente destructivo en tejidos maduros o senescentes de dicotiledóneas, también puede permanecer quiescente en estadios tempranos del crecimiento y atacar después de la cosecha de cultivos aparentemente “sanos”. Por tanto estamos hablando de un gran problema en agricultura y horticultura debido a la importante reducción de la cosecha y de las pérdidas económicas que eso conlleva.

En viñedos es donde causa mayores pérdidas económicas, debido al alto valor añadido de este tipo de cultivo, y donde se tiene un mayor conocimiento por parte del público. Considerada como una enfermedad secundaria de la vid (*Vitis vinifera*) hasta las grandes epidemias de filoxera y la reconstrucción de los viñedos por injerto, hoy en día es uno de los grandes problemas del viticultor debido a su grave incidencia sobre la calidad de los vinos.

A pesar de esto, *B. cinerea*, bajo ciertas condiciones climáticas en otoño, parasita la uva de tal forma que la piel permanece intacta mientras el interior se deshidrata, aumentando de este modo la concentración de azúcares sin que se incremente la acidez. Las uvas afectadas por esta infección son utilizadas para la producción de ciertos vinos dulces de una gran calidad, dando origen a los prestigiosos vinos de la región húngara de Tokay y Aszu, los franceses de Sauternes y los alemanes de Auslese, Beerenauslese y Trockenbeerenauslese (Jarvis, 1977).

3.1. Sistemática y descripción

El análisis filogénico de 22 especies del género *Botrytis* reveló que *B. cinerea* forma un pequeño clado junto a otras 3 especies, todas ellas patógenos especializados de dicotiledóneas (Staats *et al.*, 2005). La mayoría de las cepas de *B. cinerea* son heterotálicas y contienen uno de los dos alelos del locus MAT1 (Faretra *et al.*, 1988), aunque se tiene conocimiento de aislados de campo con fenotipo doble para este alelo (Faretra y Pollastro, 1996; van der VlugtBergmans *et al.*, 1993).

B. cinerea es la forma imperfecta o asexual del hongo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, perteneciente a la división *Ascomycota*, orden *Leotiales*, familia *Sclerotiniaceae*. Aunque normalmente se designe a los hongos por el estado sexual o teleomorfo, en este caso, el estado anamorfo, *B. cinerea* (XIth International Botrytis Symposium, 1996, Wageningen, The Netherlands) es el aceptado, siendo reconocido en todo el mundo por numerosos micólogos y fitopatólogos.

La forma teleomorfa del hongo, *B. fuckeliana*, fue descrita por de Bary en 1886 como un apotecio pedicelar de color marrón que nace sobre un esclerocio. La parte fértil está formada por ascas entremezcladas con hifas de longitud similar e incolora. Las ascas son cilíndricas, planas en la parte superior y contienen 8 ascosporas elípticas, incoloras y de dimensiones sobre 6-9 por 5-6 μm . La forma sexual es poco común en la naturaleza.

La forma anamorfa, *B. cinerea*, pertenece a la clase *Deuteromycota*, orden *Moniliales* y a la familia *Moniliaceae*. Como ascomicete típico que es, presenta un micelio tabicado, incoloro cuando

se desarrolla en el interior de la planta huésped y de color marrón oliva formando masas algodonosas de hifas de 11-23 μm de diámetro, ramificadas y entrelazadas cuando crece sobre el tejido vegetal o se cultiva sobre medios sintéticos. Este micelio genera hifas aéreas en cuyos extremos se diferencian los conidióforos. Estos conidióforos, de 1-3 mm de largo, se ramifican profusamente para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios, dando el aspecto de racimo engrosado y arborescente cargado de macroconidios. Los conidios o macroconidios (10-12 \times 8-10 μm) son ovoides o globulosos, lisos, unicelulares y ligeramente grisáceos, pudiendo contener normalmente entre 5-10 núcleos. La formación de conidios está estimulada por longitudes de onda específicas (Epton y Richmond, 1980), por lo que se usa luz UV cercano para la inducción de la esporulación *in vitro*. También se pueden producir microconidios unicelulares de 2 a 3 μm de diámetro a partir de micelio viejo.

Cuando las condiciones climáticas se vuelven desfavorables en el otoño y al principio del invierno, el micelio produce esclerocios (2-4 \times 1-3 mm) negros, discoidales y fuertemente sujetos al sustrato. Estas estructuras de resistencia representan un importante mecanismo de supervivencia y suelen ser de color blancuzco al principio, oscureciéndose posteriormente. Están formados por una médula de filamentos agregados de micelio y de una cobertura de células corticales melanizadas, que protege al micelio del interior de la desecación, de la radiación UV y del ataque de microorganismos

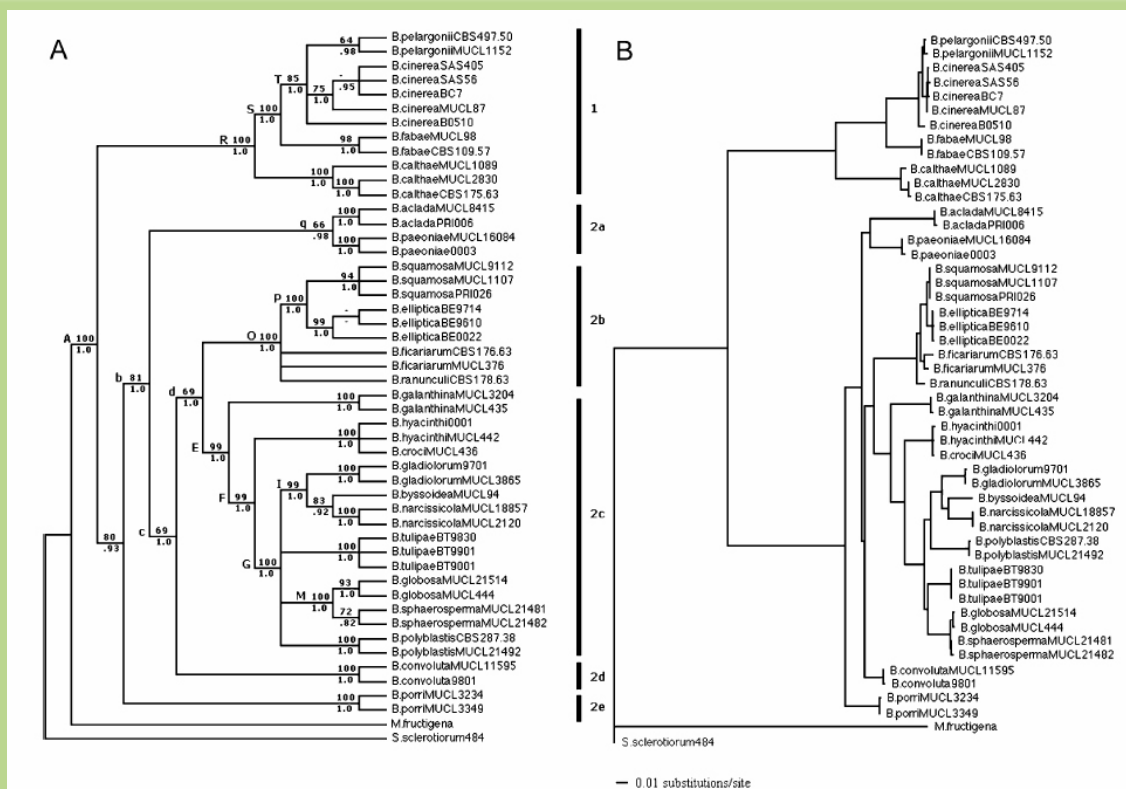


Figura 3.2
Análisis filogenético del género *Botrytis* obtenidos mediante distintas aproximaciones (Staats et al., 2005)

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

durante largos periodos de tiempo (Backhouse y Willetts, 1984). Normalmente, estos esclerocios se hacen confluyentes dando la impresión de poseer mayor tamaño.

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

3.2. Ciclo de vida

En invierno, el hongo se conserva en forma de esclerocio en tejidos senescentes del hospedador o bien como micelio sobre restos de tejido vegetal o semillas. Cuando las condiciones climáticas empiezan a ser favorables en primavera, el hongo empieza a crecer para producir conidióforos y conidios multinucleados, que serán diseminados tanto por el viento, y no tanto por la lluvia (Jarvis, 1962b), como por insectos (Holz *et al.*, 2004). Estos macroconidios van a germinar en la superficie del tejido huésped o sobre un sustrato adecuado, iniciándose la infección y propagación de la enfermedad. De esta manera se origina nuevo micelio con capacidad de esporular, completándose el ciclo de vida asexual, como se puede observar en la Figura 3.4.

El hongo también puede producir microconidios que espermatisan esclerocios de cepas de diferente sexo. La “fecundación” de estos esclerocios desencadena el ciclo sexual, produciéndose apotecios con ascas que contienen 8 ascosporas binucleadas derivadas de una meiosis. Estas ascosporas son proyectadas al exterior por un poro apical que se forma en la madurez por la presión osmótica de las vacuolas del citoplasma. Las ascosporas germinan originando un micelio que puede infectar a la planta huésped e iniciar un nuevo ciclo sexual o asexual. A pesar de esto, hay escasas notificaciones sobre la formación o recolección de apotecios en el campo y son raros o ausentes en la mayoría de los cultivos atacados por *B. cinerea*, aunque son más comunes en otras especies del género.

Como podemos intuir, los conidios constituyen la forma de propagación más importante del patógeno durante el periodo vegetativo de la planta huésped, mientras que los esclerocios y el propio micelio son los responsables de la supervivencia y su reproducción de un año al otro. Los conidios generados en los focos primarios de la infección siguen unos ciclos muy bien definidos de generación, producción y diseminación, regulados por las fluctuaciones en la temperatura y la humedad que se dan a primeras horas de la mañana (Jarvis, 1962c).

3.3. Variabilidad genética

B. cinerea ha sido descrito como un hongo con una gran plasticidad debido a su variabilidad en aspectos tales como en el crecimiento (Grindle, 1979), capacidad de supervivencia en diversos

ambientes, la rápida adquisición de resistencia a fungicidas químicos (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 1996), su patogenicidad (Lorenz, 1983) y la manera de obtener nutrientes de las células del hospedador. Esta variabilidad fenotípica supone la existencia de una variabilidad genética, cuyos mecanismos aún no se entienden en su totalidad. *B. cinerea* presenta heterocariosis, una ploidía compleja, una gran variedad de elementos génicos extracromosómicos, compatibilidad somática, ciclo sexual y una gran variabilidad genética entre poblaciones, que le confieren una estructura genética muy rica y compleja.

La formación por anastomosis de heterocariontes con distintos núcleos del mismo micelio (Hansen y Smith, 1932) puede ser la respuesta a la alta diversidad que se observa en la descendencia asexual de determinados aislados. A pesar de la escasez y poca predominancia de apotecios del teleomorfo *B. fuckeliana* (Lorbeer, 1980), no hay que subestimar la importancia de la recombinación meiótica y segregación de genes que se da durante el ciclo sexual de este hongo, que puede jugar un papel más importante en la adquisición de variabilidad que la heterocariosis (Beever y Weeds, 2004).

También tenemos elementos génicos extracromosómicos como los cromosomas de la mitocondria, virus, plásmidos y transposones (Rosewich y Kistler, 2000). El DNA mitocondrial ofrece una fuente de variación genética distinta de la nuclear (Typas *et al.*, 1998). En las mitocondrias de este hongo encontramos tanto un genoma circular de unas 25,8 kb (Vallejo *et al.*, 1996) como

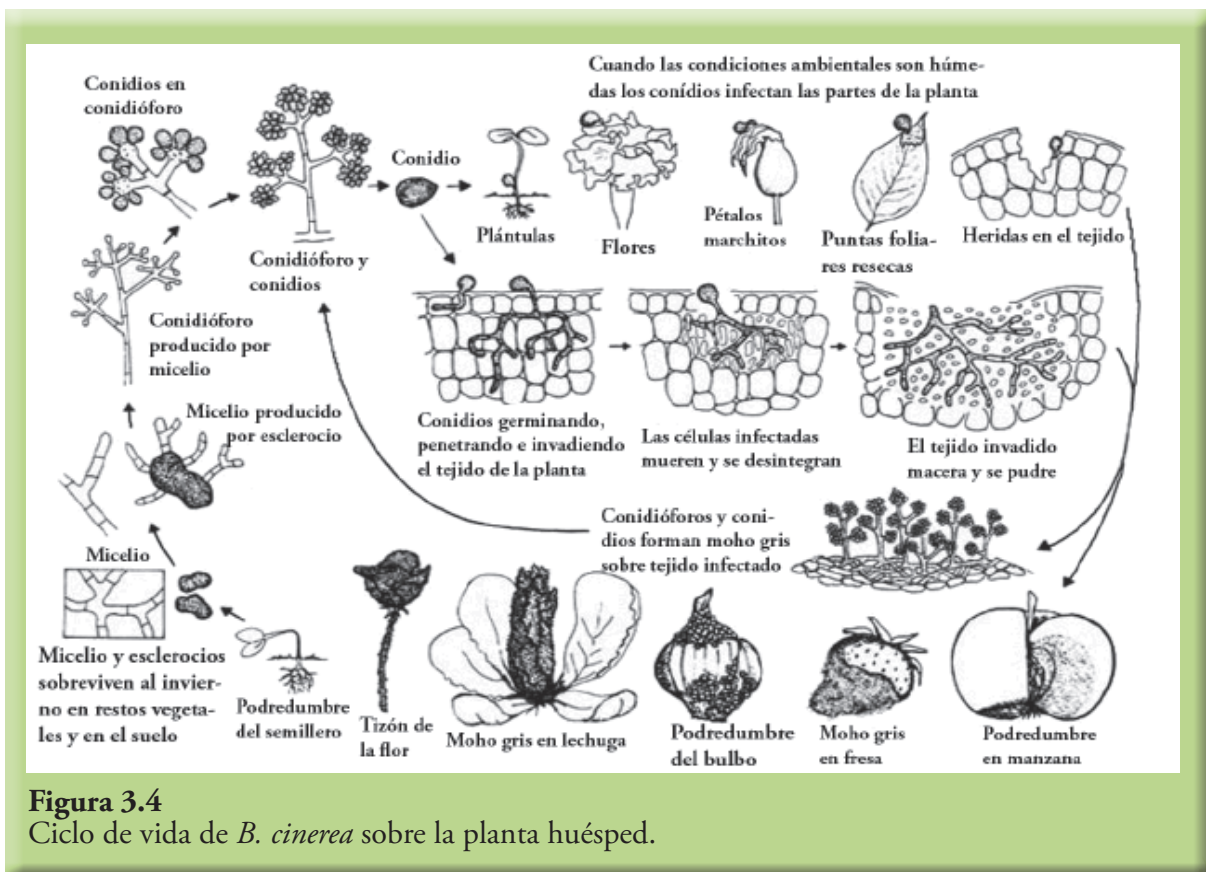


Figura 3.4
Ciclo de vida de *B. cinerea* sobre la planta huésped.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

plásmidos lineales de 2-3 kb (Hiratsuka *et al.*, 1987). Se ha podido comprobar la transferencia de genes por transferencia directa horizontal (Rosewich y Kistler, 2000). Además, se han observado en varias cepas de *B. cinerea* dos transposones, *Boty* de 6 kb y *Flipper* de 1,8 kb, que pueden encontrarse por separado o juntos (Beever y Weeds, 2004). La presencia de micovirus en el genoma de *B. cinerea* se ha documentado, aunque no hay evidencias de que tengan un efecto sobre el fenotipo (Howitt *et al.*, 1995).

La variabilidad genética de las poblaciones de *B. cinerea* se ha estudiado usando una gran variedad de técnicas moleculares. El estudio de RFLP mostró una elevadísima diversidad genética en esta especie: incluso aislados procedentes de la misma planta mostraban diferentes haplotipos y hasta cinco haplotipos diferentes fueron purificados a partir de un único fruto infectado (Giraud *et al.*, 1997). El uso de marcadores de tipo RAPD demostró la gran variabilidad genética y la segregación no mendeliana de los marcadores RAPD usados, además de no estar ligados (van der VlugtBergmans *et al.*, 1993). Otros estudios con RAPD han reforzado la hipótesis que sugiere que la propagación clonal en las poblaciones de *B. cinerea* es mínima y que la recombinación juega un papel importante, debido a la imposibilidad de establecer relación entre los aislados analizados en cuanto a niveles de patogenicidad, origen o año de aislamiento (Kerssies *et al.*, 1997) o la presencia de diferentes haplotipos en aislados procedentes de la misma planta e incluso del mismo fruto (Giraud *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 1997). Estudios sobre la variabilidad detectada en genes que codifican proteínas mostraron la existencia de un elevado grado de polimorfismo, aunque la influencia de esta variabilidad en patogenicidad sea limitada (Rowe y Kliebenstein, 2007).

Otros estudios indican que entre las poblaciones de aislados recogidos en invernaderos existe un muy alto grado de diversidad genética, aunque la diferencia entre las subpoblaciones sea muy reducida (Alfonso *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2003b).

El estudio de la distribución de dos transposones distintos, *Boty* y *Flipper*, en aislados silvestres de *B. cinerea*, sugiere que en la naturaleza están coexistiendo dos especies de *B. cinerea* muy próximas entre sí, pero genéticamente diferentes (Diolez *et al.*, 1995; Levis *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta, además, los resultados derivados de análisis filogenéticos llevados a cabo sobre varios genes analizados conjuntamente, Fournier y colaboradores postularon que *B. cinerea* es un complejo de especies que comprende dos especies distintas (Fournier *et al.*, 2005). Esta hipótesis, no obstante, no ha sido todavía completamente aceptada por la comunidad de *Botrytis*.

3.4. Epidemiología y ciclo de la enfermedad

B. cinerea demuestra tener una gran adaptabilidad frente a las condiciones ambientales para germinar y obtener nutrientes de la planta huésped. El ciclo de infección general de *B. cinerea* sobre un huésped comienza cuando los conidios, transportados a grandes distancias por corrientes de aire o transportadas por insectos, entran en contacto con la superficie del huésped.

Si las condiciones ambientales lo permiten, un tubo de germinación se abre camino por la superficie del huésped y la fase de adhesión y germinación tiene su comienzo. Durante esta fase el conidio se ha descrito, en algunos sistemas, la formación de apresorios (estructuras especiales necesarias para la penetración) en el extremo del tubo germinativo y antes de que éste penetre directamente a través del tejido intacto del hospedador. La formación de apresorios por *B. cinerea* está confirmada tanto por estudios citológicos (Tenberge, 2004) como genéticos (Gourgues *et al.*, 2004), además de la formación de una matriz extracelular alrededor de la zona de penetración. Tanto la longitud del tubo germinativo como la secreción de la matriz extracelular pueden verse incrementados si los conidios son inoculados en suspensiones acuosas, en vez de inoculaciones en seco (Cole *et al.*, 1996). Los apresorios formados por *B. cinerea* son distintos a los formados por especies de los géneros *Colletotrichum* o *Magnaporthe*, en cuanto que, a pesar de contener melanina en la matriz celular asociada a la pared celular fúngica (Doss *et al.*, 2003), carecen de septo que aisle el apresorio del tubo germinativo y que resulta necesario para generar las altas presiones osmóticas que se dan en el caso de *M. grisea*. Por esta razón es poco probable que los apresorios de *B. cinerea* sean suficiente, aunque si sean necesarios (Gourgues *et al.*, 2004), para que la penetración en el tejido del hospedador sea exitosa. Lo más lógico es pensar que los apresorios sean estructuras especializadas en la secreción de una amplia batería de enzimas necesarias para traspasar la cutícula de la planta.

En plantas de frutos pequeños, los órganos florales son sitios importantes para el inicio de la infección. En algunos tipos de flores, el fluido estigmático se convierte en un medio nutritivo para el conidio. Incluso el tubo germinativo puede abrirse paso hasta el gineceo siguiendo el camino que crean los tubos polínicos. Los pétalos también son importantes puntos de infección en muchos cultivos, ya que pasan a ser vehículos del inóculo al ser arrancados por el viento o productores de inóculo de segunda generación (Johnson y Powelson, 1982). La humedad relativa es un elemento crucial para el éxito de la infección, como pasa en pétalos de rosas (Williamson *et al.*, 1995). Una continua exposición a humedad relativa alta conduce a una serie sucesiva de ciclos de infección y esporulación, haciendo que el cultivo se pierda. Los insectos tienen un papel importante no solo en la dispersión de los conidios, también como causantes de lesiones que sirven de entrada al patógeno.

Una vez el hongo ha penetrado en el tejido vegetal, la muerte de células adyacentes al punto de penetración y la formación de una lesión primaria como consecuencia de la respuesta de defensa de la planta, determinan el establecimiento del patógeno. En este momento, se inicia una fase de latencia durante los cuales los mecanismos de defensa parecen controlar al patógeno, permaneciendo localizado en áreas de necrosis que se corresponden con las lesiones primarias. Transcurrido un tiempo, y sólo en algunos casos, el hongo es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación por el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar de nuevo el ciclo de infección.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

3.5. Rango de hospedadores y sintomatología

B. cinerea infecta a más de 200 especies vegetales en climas templados, incluyendo cultivos de gran importancia económica. Además de tener un amplio espectro de hospedadores, es necesario tener en cuenta que *B. cinerea* puede atacar y afectar a distintos órganos vegetales, como flores, frutas, hojas, brotes y bulbos (Droby y Lichter, 2004; Jarvis, 1980; Maude, 1980). Verduras (lechuga, repollo, judías, etc.) y cultivos con bayas y otros frutos pequeños (uva, fresa, frambuesa, etc.) son los que sufren un mayor ataque. En cultivo de fresa, *B. cinerea* es capaz de infectar tanto tejidos vegetales jóvenes como senescentes, convirtiéndose en una de las enfermedades más importantes de este cultivo (Powelson, 1960). Tampoco hay que olvidar los daños producidos en frutos como el kiwi, manzana y pera.

En cultivos bajo cubierta (especialmente de tomate, pepino, pimiento o albahaca) el riesgo de infección aumenta de manera cuantitativa, teniendo a *B. cinerea* como uno de sus mayores problemas, ya que en épocas frías, periodo de máxima actividad de los invernaderos, se dan las mejores condiciones para el desarrollo del hongo. El uso de productos químicos produce rápidamente resistencias en el hongo, lo que agrava el problema considerablemente, y fuerza la implementación de sistemas de control integrado (Moyano *et al.*, 2003). *B. cinerea* también es una enfermedad muy común en invernaderos de plantas ornamentales, como rosa (Coyier, 1985) *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker, *Begonia tuberhybrida* Voss, *Cyclamen persicum* Mill, *Saintpaulia ionantha* H. Wendl, (Palmucci *et al.*, 1997), Geranio (Hausbeck y Pennypacker, 1991), Gerbera (Salinas y Verhoeff, 1995), *Poinsettia* (Pritchard *et al.*, 1996), etc., especies en las que provoca, como mínimo, lesiones en los pétalos y hojas que reducen drásticamente su valor en el mercado.

A parte de estos cultivos, también sufren el ataque y las consecuentes pérdidas de manera más dramática, los garbanzos y otras leguminosas ricas en proteínas (Pande *et al.*, 2002). Los cultivos de alfalfa (Gossen y Platford, 1999; Gossen *et al.*, 1994), plántulas de conífera (Carlson, 1986; Riffle y Smith, 1979) y el cáñamo (Barloy y Pelhate, 1962) pueden ser muy vulnerables al ataque de este patógeno.

El mayor daño ocasionado por *B. cinerea* se da en tejidos senescentes de frutos cosechados, siendo un problema importante en frutas y verduras conservadas en frío. Esto hace que sea uno de los principales hongos que afectan a la post-cosecha de muchas frutas y verduras sobre las cuales causa importantes daños con una enorme depreciación económica. La alta humedad relativa, la proximidad de los frutos y la baja temperatura, junto con la restricción del control químico (por no poder cumplirse los plazos de seguridad), favorecen que la magnitud del daño ocasionado por el hongo sea mayor.

El ataque de este hongo sobre la gran variedad de cultivos afectados y sobre sus diversos órganos da lugar a un amplio rango de síntomas que no pueden ser englobados ni clasificados de una manera simple.

La infección sobre plantas recién germinadas ha sido constatada sobre 50 hospedadores, incluyendo el girasol, el lino, el garbanzo (Burgess *et al.*, 1997b), la lechuga y las anteriormente citadas coníferas (Maude, 1980).

El síntoma más común sobre hojas y frutos blandos puede ser la formación de áreas con podredumbre blanda acompañada de la maceración de los tejidos vegetales y seguida de una rápida aparición de masas pulverulentas grises de conidios (Powelson, 1960). En frutos con cutículas más gruesa la maceración es sólo visible una vez el fruto es pelado y su interior procesado. En otros frutos y plantas la infección empieza en flores senescentes que permanecen en la planta y que acaban infectando los frutos cercanos que se estén desarrollando en la planta. Sobre las flores se pueden observar los efectos manifestados como desde simples manchas sobre los pétalos a la completa pudrición de la flor. En cultivos bajo cubierta e invernaderos, el hongo causa el mayor daño en los tallos, cuando éstos son podados y las heridas se convierten en la vía de entrada del ataque a todo el tallo.

En muchos casos la podredumbre sólo se manifiesta después de la recolección de los frutos, y aunque las defensas de la planta hayan contenido el ataque, el aspecto que presentan los frutos no permite su comercialización.

3.6. Estrategias de control

Dado el interés económico que subyace detrás de la podredumbre gris, se han destinado muchos recursos técnicos y económicos para desarrollar estrategias que eviten, o al menos mitiguen, los daños producidos por el ataque de *B. cinerea*. Estas estrategias se pueden agrupar en cuatro categorías: control químico, control biológico, prácticas y métodos de cultivo y mejora genética de la resistencia a la enfermedad.

3.6.a. Control químico

Los fungicidas usados para el control químico de *B. cinerea* pertenecen a varias familias (Leroux, 2004) y se agrupan en cinco categorías nombradas según afecten a la respiración del hongo, al ensamblaje de microtúbulos, a la osmoregulación, que inhiban la biosíntesis de esteroides o que su acción sea revertida por aminoácidos (Rosslénbroich y Stuebler, 2000).

Agentes multiana que afectan a la respiración del hongo, como tiram, mancozeb, captan, diclofluanida y tolifluanida, han sido usados ampliamente y durante tiempo sin que ello haya redundado en un desarrollo significativo de las resistencias.

Los metil benzimidazol carbamatos que inhiben la formación de la β -tubulina favorecen rápidamente el desarrollo de resistencias mediadas por el gen Mbc1 (Weeds *et al.*, 1999). Para evitar resistencias se han utilizado altas concentraciones del principio activo, haciendo que el agente químico permanezca durante largos periodos en el cultivo, con la consiguiente acumulación de

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

residuos, razón por la cual su uso ha sido restringido o abandonado. Las strobirulinas, que inhiben la respiración mitocondrial al unirse al citocromo b, son fungicidas de amplio espectro que controlan *B. cinerea* además de otros patógenos. Algunas carboximidazidas son capaces de inhibir el complejo succinato deshidrogenasa (complejo mitocondrial II) de *B. cinerea* y de otros Ascomicetes y Adelomicetes.

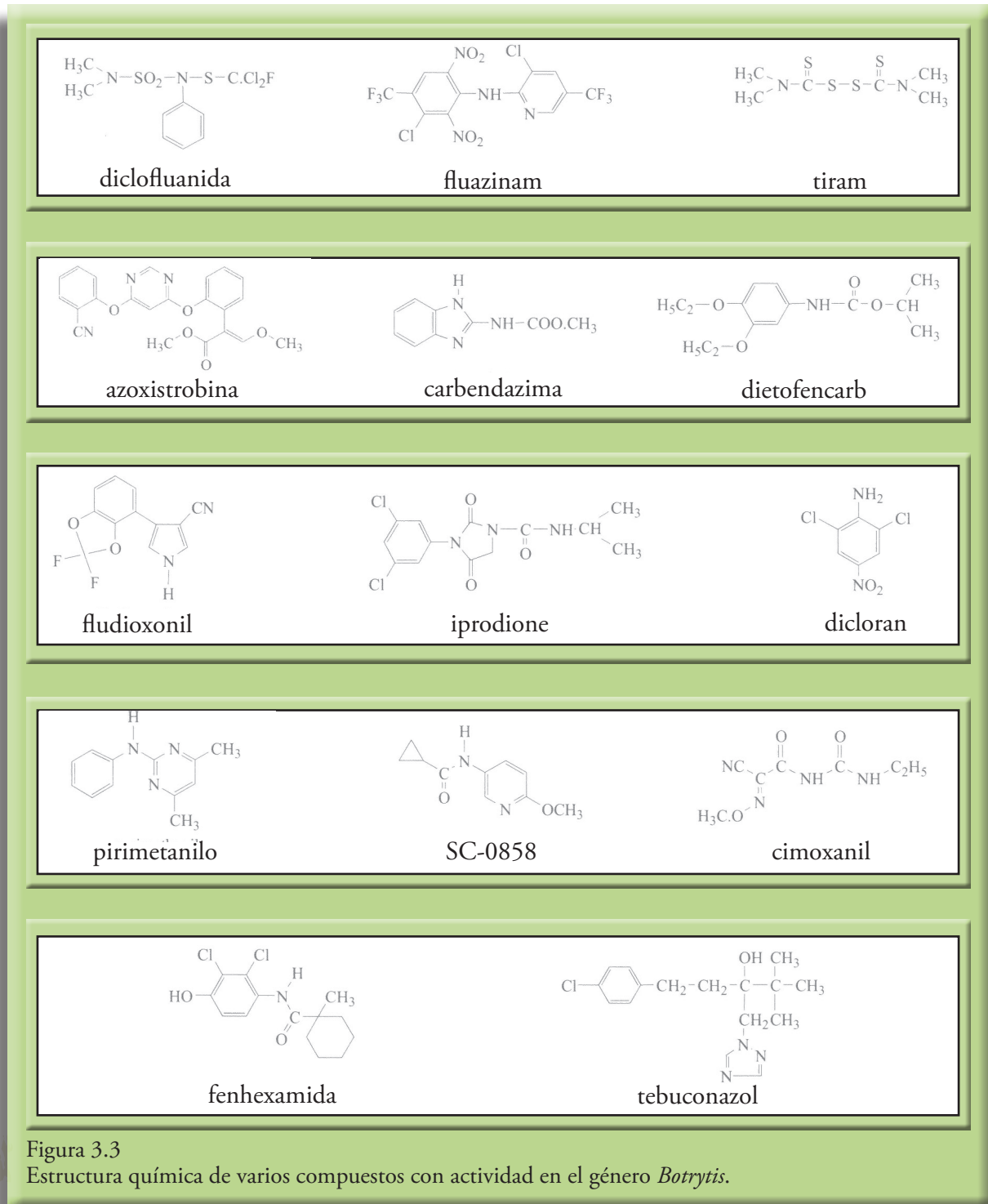


Figura 3.3
Estructura química de varios compuestos con actividad en el género *Botrytis*.

Las dicarboximidas, que afectan al control del equilibrio osmótico de conidios y micelio, han sido utilizadas ampliamente contra *B. cinerea*. Se han detectado y analizado genes, Daf1 (Faretra y Pollastro, 1991), BcOS1 (Leroux *et al.*, 2002) o Bos1 (Cui *et al.*, 2002), que son responsables de la resistencia frente a estos compuestos, aunque confieren una menor viabilidad a las cepas resistentes (Beever *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 2000). El fludioxonil, perteneciente a los fenilpirroles, presenta una gran resistencia a la degradación por luz solar debido a sus anillos de fenilo. Es un fungicida no sistémico cuya diana de acción está en las cascadas de señalización de osmoregulación (Pillonel y Meyer, 1997). Inhibe la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio. Existe resistencia cruzada entre fenilpirroles y dicarboximidas debido a la existencia de dos genes situados en el mismo locus (Vignutelli *et al.*, 2002), aunque no se ha encontrado resistencia cruzada en campo (Hilber *et al.*, 1995).

Las anilino pirimidinas ciprodinilo, pirimetanilo y mepanipirima, químicamente muy relacionados, son inhibidores de la biosíntesis de la metionina y otros aminoácidos, además de inhibir la secreción de enzimas hidrolíticas que juegan un papel fundamental en la patogénesis (Milling y Richardson, 1995; Miura *et al.*, 1994). El efecto sobre el hongo se traduce en una inhibición de la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial inicial. *B. cinerea* es capaz de generar resistencia a las anilino pirimidinas (Moyano *et al.*, 2004) y, a su vez, no perder la capacidad de crecimiento e infección (Bardas *et al.*, 2008).

Las hidroxianilidas, representadas por la fenhexamida, tienen un modo de acción diferente a las otras clases de fitosanitarios, al inhibir la biosíntesis de esteroides, los cuales están relacionados con la integridad y función de la membrana citoplasmática (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Se ha descrito resistencia a este químico, aunque no se ha observado resistencia cruzada con benzimidazoles y carboximidas (De Guido *et al.*, 2007).

La resistencia múltiple presente en algunas cepas de *B. cinerea* normalmente está asociada a la acción de las familias de transportadores ABC o MFS, responsables del transporte de moléculas a través de la membrana plasmática (de Waard *et al.*, 2006).

Desde la aparición de los metil benzimidazol carbamatos (MBC) se tiene constancia de que las probabilidades de que *B. cinerea* desarrolle resistencia a nuevos productos fitosanitarios es alta si el producto se aplica repetidamente. Debido a esto, se han diseñado programas de fumigación que intercalan el uso de fungicidas con diferente modo de acción sobre el hongo, reduciendo así el riesgo de aparición de resistencias, pero teniendo en cuenta el no alcanzar los límites de residuos permitidos. El problema surge cuando el cultivo a tratar necesita protección continuada debido a cosechas consecutivas. Asimismo, el tiempo desde la aplicación del fitosanitario y la recolección puede ser insuficiente para la protección del cultivo y para evitar niveles altos de residuos en el producto, no siendo de utilidad el control químico. Por consiguiente, múltiples estrategias de control se han desarrollado como alternativa. Tal es el caso de extractos de semilla de pomelo en uva de mesa (Xu *et al.*, 2007), la bacteria *Rahnella aquatilis* en manzana (Calvo *et al.*), los compuestos volátiles

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

emitidos por la baya de *Vitis lambrusca* en kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Kulakiotu *et al.*, 2004) o el metil jasmonato en flores cortadas de *Freesia hybrida* (Darras *et al.*, 2007).

3.6.b. Control biológico

El uso del control biológico se ha incentivado en aquellos casos en los que el uso de fitosanitarios ha sido restringido debido a los residuos acumulados por el uso continuado en las producciones agrícolas, o bien por las restricciones legales de los países importadores o normativas vigentes estrictas de los países productores. El estudio de la ecología microbiana de los últimos años ha mostrado la posibilidad de usar antagonistas microbianos para el control de *B. cinerea*, debido a que esta especie es muy susceptible a la competencia por nutrientes, que puede afectar a la germinación y al desarrollo del tubo germinativo, y es muy sensible al efecto de antibióticos y enzimas líticas de origen microbiano, que pueden inhibir la germinación y lisar sus tubos germinativos. El efecto supresor sobre la enfermedad se debe a una reducción de la capacidad saprofitica, diseminación de esporas, virulencia, o resistencia inducida en la planta huésped (Elad y Freeman, 2002). Estos agentes de control biológico utilizados incluyen desde hongos filamentosos, como *Trichoderma harzianum* (De Meyer *et al.*, 1998; Elad, 2000), *Gliocladium roseum* (Burgess *et al.*, 1997a; Sutton *et al.*, 1997) y *Ulocladium atrum* (Köhl *et al.*, 1995), levaduras como *Pichia guilliermondii* (Wisniewski *et al.*, 1991), *Candida* spp. (McLaughlin *et al.*, 1990; Mercier y Wilson, 1994) y *Cryptococcus albidus* (Elad, 1996; Helbig, 2002), hasta bacterias como *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas syringae* (Elad y Stewart, 2004b). Normalmente estos agentes son dispersados sobre el cultivo mediante fumigaciones, aunque se han usado abejas en el cultivo de fresa con resultados satisfactorios (Bilu *et al.*, 2004; Kovach *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1992). Sin embargo, los agentes de control biológico presentan una serie de problemas como rangos limitados de temperatura (Dubos, 1992) y humedad para una máxima eficiencia. Además la influencia de las fluctuaciones naturales de la microflora nativa según los cambios en el ambiente y en los exudados de la planta puede minimizar las posibilidades de éxito.

3.6.c. Prácticas culturales

Los efectos de la podredumbre gris se ven potenciados en condiciones de alta humedad, baja luminosidad y temperaturas moderadas. Una alta humedad promueve la generación de conidios y permite la germinación y penetración en el huésped. Una reducción de la cubierta vegetal facilita la aireación y minimiza los parámetros de las condiciones que favorecen el desarrollo de *B. cinerea*. El uso de túneles de plástico o coberturas protectoras de la lluvia permite reducir los efectos de la enfermedad durante el periodo de floración de cultivos de frutos blandos, como la fresa o frambuesa (Xiao *et al.*, 2001). El uso de ventilación para reducir la humedad relativa en cultivos bajo cubierta

se ha mostrado muy eficiente. La utilización de cubiertas plásticas con filtros UV que modifiquen el espectro de la luz solar reduce la formación de conidios y la infección en varios cultivos (Reuveni y Raviv, 1992; Reuveni *et al.*, 1989; West *et al.*, 2000). En invernaderos fríos, evitar la formación de rocío sobre las hojas del cultivo antes del amanecer mediante un breve calentamiento del aire puede controlar la aparición de podredumbre gris (Dik y Wubben, 2004).

El manejo post-cosecha de los cultivos se basa principalmente en la utilización de la cadena de frío continuada en frutos no madurados que han sufrido daños mínimos. Pero si la cadena de frío se ve alterada en algún punto de este proceso, el patógeno puede reactivarse y afectar a todo el cargamento.

La predicción de la enfermedad en combinación con datos meteorológicos precisos, ha resultado muy eficaz en la reducción de los daños producidos por el hongo (Berrie *et al.*, 2000; Broome *et al.*, 1995). Además, el uso de prácticas de control integrado, como el uso de distintos agentes químicos para evitar la aparición de resistencias, el esfuerzo de aplicar en menor medida los pesticidas para mantener al mínimo el nivel de residuos, la utilización de agentes biológicos de control apropiados al régimen de temperatura y humedad, la eliminación escrupulosa de restos vegetales del cultivo para eliminar posibles focos de infección futuro, el espaciado del cultivo o podas adecuadas y constantes para asegurarse una buena ventilación, etc... pueden prevenir de una manera asombrosa el ataque de *B. cinerea* y reducir de una manera considerable las pérdidas por podredumbre gris.

3.6.d. Mejora genética

La búsqueda de resistencias contra *B. cinerea* en cultivos parece ser una estrategia difícil y compleja, ya que no se han descrito genes de resistencia frente a este patógeno en ninguna especie vegetal. Esto puede ser debido en gran medida a la gran diversidad de mecanismos de infección que este patógeno presenta. En algunos cultivares de algunas especies, propiedades morfológicas (tales como el grosor de la cutícula o la velloidad de la epidermis) o diferencias en el crecimiento (por ejemplo en la maduración de los frutos o en la densidad de frutos en el racimo o de las hojas) pueden facilitar que la planta evite o escape a la acción del patógeno. Estas características suelen ser caracteres poligénicos, controlados por un número variable de genes, lo que complica su transferencia a los cultivares de interés. No obstante se han logrado resultados parciales interesantes en algunos casos. Especies silvestres del género *Solanum*, relacionadas estrechamente con el tomate (*Solanum lycopersicum*), han mostrado tener cierta resistencia en hojas y tallos (Guimarães *et al.*, 2004; ten Have *et al.*, 2004). Se han identificado varios QTLs para resistencia a *B. cinerea* pertenecientes al genotipo de *Solanum habrochaites* (Finkers *et al.*, 2007a), ofreciendo su uso unas excelentes perspectivas para la mejora del control de la enfermedad en el cultivo del tomate.

El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia permitiría el desarrollo y uso de técnicas de transferencia génica para mejorar y aumentar la respuesta defensiva del huésped, sin afectar

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

a otras características del cultivo importantes para el agricultor y el consumidor.

A pesar de todos los avances en el campo molecular, todavía no se ha encontrado ningún fungicida que actúe a nivel molecular con efectos notables. La diversidad de factores de virulencia que intervienen en el proceso infectivo de *B. cinerea* hacen que no haya una solución única al problema. Además, la controversia de los cultivos transgénicos en Europa presenta un problema social y económico importante, ralentizando la experimentación con plantas transgénicas y su aplicación en la agricultura.

4. Interacción *B. cinerea* - huésped

4.1. Mecanismos de patogenicidad en *B. cinerea*

B. cinerea es considerado en la actualidad un excelente modelo para estudiar y caracterizar la naturaleza del hongo patógeno necrotrofo (van Kan *et al.*, 2006). Son numerosos los trabajos y los estudios llevados a cabo en estos últimos años que desde una perspectiva molecular tienen por objeto caracterizar los principales mecanismos y factores de patogenicidad que participan en cada fase del ciclo de infección del hongo. Realizamos a continuación una breve descripción de las principales observaciones y conclusiones que ha sido posible realizar sobre los mismos en cada caso.

4.1.a. Dispersión

El primer contacto con el huésped se puede producir a partir de conidios, micelio o esclerocios, siendo los conidios el principal medio de dispersión del patógeno. No obstante, el micelio y los esclerocios presentes en restos vegetales abandonados en el campo y procedentes de campañas anteriores constituyen un foco de infección a tener en cuenta.

Los conidios, presentes en el aire, pueden ser transportados a grandes distancias por medio del viento o por insectos antes de infectar un nuevo huésped. Asimismo las heridas causadas en el tejido vegetal por los insectos o por medios mecánicos aumentan el desarrollo de la enfermedad.

4.1.b. Adhesión

Antes de que el patógeno pueda penetrar en el tejido del huésped, el conidio debe adherirse a la superficie de la planta. Este proceso de adhesión se produce en dos etapas.

En un primer momento las interacciones hidrofóbicas entre el huésped y la superficie del conidio producen unas fuerzas débiles de adhesión (Doss *et al.*, 1993). Los conidios tienen una superficie hidrofóbica que presenta numerosas protuberancias de unos 200-250 nm que desaparecen después de la hidratación y podrían estar implicadas en el proceso de adhesión.

Transcurridas varias horas después de la inoculación, se producen fuertes uniones entre las superficies del conidio y la célula vegetal debido a la matriz fibrilar generada en el extremo apical de los tubos germinativos desarrollados a partir del conidio (Cole *et al.*, 1996). Esta funda fibrilar está constituida por un polímero extracelular denominado cinereano, y su formación coincide con

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

el momento en que la adhesión se produce mediante uniones de tipo fuerte (Doss *et al.*, 1995). En experimentos de inoculación con conidios secos, esta matriz extracelular no se produce (Cole *et al.*, 1996) y en inoculaciones con medios artificiales, la ausencia de glucosa en el medio desencadena que *B. cinerea* degrade este polímero en glucosa y gentobiosa, que a su vez es hidrolizada a glucosa (Monschau *et al.*, 1997; Stahmann *et al.*, 1992) y que utiliza como fuente de carbono. De esto se concluye que el cinereano puede jugar un papel importante en la protección del patógeno frente a la deshidratación y frente a los mecanismos de defensa de las plantas, aunque no sea esencial para la adhesión de los conidios.

4.1.c. Germinación

Una vez los conidios se han adherido a la superficie del huésped, la germinación se produce si la humedad relativa es alta o hay agua disponible sobre la superficie del tejido del huésped (Blakeman, 1980; Williamson *et al.*, 1995). Además, la germinación se ve favorecida por la presencia de glucosa y de fosfatos (Akutsu *et al.*, 1981; Harper *et al.*, 1981; van den Heuvel, 1981). Los fosfatos pueden ser los responsables de estimular la actividad de las enzimas pectolíticas que *B. cinerea* excreta (van den Heuvel y Waterreus, 1983) y la glucosa favorece el crecimiento superficial y la formación de estructuras de penetración (Akutsu *et al.*, 1981). Hay que destacar que también se ha propuesto que la glucosa probablemente interviene además en los procesos oxidativos que inducen la muerte celular del huésped (Edlich *et al.*, 1989). De estas observaciones podemos concluir que la presencia de nutrientes en la solución de inoculación imita en buena medida las condiciones que el patógeno encuentra cuando el micelio crece en tejido vegetal o muerto, como se ha podido demostrar en experimentos de inoculación artificial con medio líquido suplementado con glucosa y fosfato (Benito *et al.*, 1998).

Algunos compuestos gaseosos también podrían estar implicados en la estimulación de la germinación, como el etileno (Elad y Volpin, 1988; McNicol *et al.*, 1989). La producción de etileno, relacionado con el debilitamiento del tejido del huésped y la senescencia, parece favorecer el desarrollo de la podredumbre gris, al estimular la germinación de los conidios (Kepcsynski y Kepcynska, 1977) y el crecimiento de los tubos germinativos (Barkai-Golan *et al.*, 1988).

4.1.d. Penetración

Cuando el conidio aterriza y se adhiere al huésped, el patógeno debe penetrar la superficie, bien a través de los estomas (Verhoeff, 1980) o directamente a través de la cutícula, formada por cutina cubierta de ceras. Para atravesar esta primera barrera que presenta la planta (la cutícula), es necesario que *B. cinerea* desarrolle apresorios (Gourgues *et al.*, 2004; Tenberge, 2004).

Estos apresorios, más que ser estructuras para la rotura mecánica de la cutícula, como en el caso de *M. grisea* (de Jong *et al.*, 1997), presuntamente secretan enzimas. La incapacidad de *B. cinerea* de generar grandes presiones por no tener el septo que separa el apresorio del tubo germinativo, necesario para generar altas presiones osmóticas, la carencia de las grandes cantidades de melanina que poseen los apresorios *M. grisea* (Doss *et al.*, 2003), junto con el hecho de que los orificios por donde penetra el hongo se deben en gran medida a una acción enzimática, dado que presentan bordes lisos y no hendidos o quebrados como pudiera ocurrir por una rotura mecánica (McKeen, 1974; Rijkenberg *et al.*, 1980) sugieren fuertemente que el mecanismo mediante el cual *B. cinerea* se abre paso a través de la cutícula no es un sistema basado en la penetración mecánica.

Las cutinasas, responsables de la degradación de la cutina de la cutícula, juegan un papel importante en esta primera fase (Linskenn y Haage, 1963; Salinas, 1992; Shishiyama *et al.*, 1970), aunque la primera y única cutinasa de *B. cinerea* con la que se ha llevado a cabo un análisis funcional detallado no sea esencial para el proceso de penetración (van Kan *et al.*, 1997). El genoma de *B. cinerea* contiene genes para múltiples cutinasas y lipasas cuya función todavía no se ha dilucidado.

Una vez superada la barrera que es la cutícula, el hongo crece a lo largo de la pared anticlinal de las células epidérmicas subyacentes (Mansfield y Richardson, 1981). En este nuevo ambiente, rico en pectinas, las enzimas implicadas en el establecimiento de las lesiones primarias son las pectinasas de *B. cinerea*. Una característica común de las especies vegetales colonizadas por *B. cinerea* es su alto contenido en pectina en la pared celular. Especies vegetales con bajo contenido de pectina son considerados huéspedes poco probables, por lo que se infiere que *B. cinerea* posee una maquinaria pectinolítica muy efectiva. Estas pectinasas están representadas por seis endopoligalacturonasas (Wubben *et al.*, 2000), cuya expresión durante el proceso de infección varía dependiendo de la especie vegetal atacada, el tipo de tejido y las condiciones de incubación (ten Have *et al.*, 2001). Se ha demostrado que dos de los genes de endopoligalacturonasas, BcPG1 y BcPG2, tienen una elevada influencia en la virulencia del hongo sobre varios huéspedes (Kars *et al.*, 2005a; ten Have *et al.*, 1998).

Las enzimas capaces de degradar hemicelulosas, como la endo- β -1,4 xilanasas, tienen un pronunciado efecto en la virulencia de *B. cinerea*. La delección del gen *xyn11A* produce un retraso de la aparición de lesiones secundarias y una reducción en el tamaño medio de lesión en más de un 70% (Brito *et al.*, 2006).

Otro grupo de enzimas estudiadas que presuntamente utiliza *B. cinerea* durante la infección son las pectin-metilesterasas (PME), encargadas de la despolimerización de pectinas altamente metiladas y favorecer así la acción de las endopoligalacturonasas. En contra de lo que se pensaba, su papel parece ser de poca relevancia, incluso en tejidos con pectinas altamente metiladas (Kars *et al.*, 2005b). También se ha detectado la acción de proteasas aspárticas extracelulares antes de la aparición de actividad pectinasa. Al igual que en el caso anterior, a pesar de que un inhibidor específico de la proteasa aspártica redujera la infección de manera notable (Movahedi y Heale, 1990), los mu-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

tantes en el gen *BcAP1* no presentan diferencias con la cepa silvestre a la hora de infectar. El estudio de las celulasas tampoco ha dado buenos resultados por el momento (Espino *et al.*, 2005).

4.1.e. Muerte celular

Como patógeno necrotrofo que es, *B. cinerea* necesita matar las células del huésped antes de que sus hifas las invadan y descompongan el tejido vegetal para alimentar al hongo (Clark y Lorbeer, 1976). La invasión de los tejidos vegetales por el patógeno activa su programa de muerte celular, ya que se observan procesos de condensación nuclear y de alteración y destrucción de la membrana celular en las células del huésped característicos de aquella (Govrin y Levine, 2000). Esto nos hace intuir que, además de poseer enzimas líticas, *B. cinerea* es capaz de generar una gran cantidad de metabolitos de bajo peso molecular y proteínas fitotóxicas que facilitan la activación de los mecanismos de muerte celular en el hospedador.

4.1.e.1. Metabolitos de bajo peso molecular

De los metabolitos fitotóxicos de bajo peso molecular que *B. cinerea* produce, el más estudiado es el botridial (Colmenares *et al.*, 2002). El botridial fue primeramente descubierto en medio líquido y por estudios espectroscópicos ha sido posible determinar la concentración del botridial en plantas infectadas, resultando en la afirmación de que es un factor esencial, pero no primario, de la infección (Deighton *et al.*, 2001). La ruta biosintética del botridial ha sido estudiada bioquímicamente (Colmenares *et al.*, 2002) y numerosos genes relacionados con su síntesis han sido identificados, los cuales están localizados en un cluster que contiene genes de oxigenasas y ciclasas. Uno de estos genes, *bcbot1*, forma parte de la ruta, aunque su efecto en patogenicidad varía entre distintas cepas de *B. cinerea* (Siewers *et al.*, 2005). Algunas cepas usan el botridial como única toxina para matar las células del huésped, mientras que otras cepas basan su patogenicidad en otras toxinas diferentes, como las botcinolidas (Reino *et al.*, 2004).

4.1.e.2. Choque oxidativo

Un factor que parece tener un papel importante durante la infección por parte de *B. cinerea* es el choque oxidativo que desencadena el hongo durante la penetración de la cutícula (Tenberge, 2004; Tenberge *et al.*, 2002) y la formación de lesiones primarias (Lyon *et al.*, 2004). Este choque oxidativo es característico de la respuesta de hipersensibilidad que confiere resistencia a patógenos biotrofos. Como *B. cinerea* es un patógeno necrotrofo, se beneficia de esta muerte celular de la planta, haciéndola más propensa al ataque (Govrin y Levine, 2000). En hojas de tomate y judía infectadas por *B. cinerea* se pueden observar grandes cantidades de H_2O_2 , tanto en la membrana plasmática de la planta como en la matriz que cubre la superficie del extremo apical del apresorio del hongo

(Schouten *et al.*, 2002; Tenberge *et al.*, 2002). La acumulación de radicales libres en los tejidos de la planta conduce a su peroxidación y al agotamiento de antioxidantes, modificando la estructura química de la cutina y de las membranas lipídicas de la cutícula (Edlich *et al.*, 1989), proporcionando un sustrato más fácil de descomponer por las oxidasas del hongo (Schouten *et al.*, 2002).

4.1.e.3. Ácido oxálico

Tanto *B. cinerea* como *S. sclerotiorum* son grandes productores de ácido oxálico (Germeier *et al.*, 1994). El ácido oxálico, oxalato o ácido dicarboxílico es una molécula simple y versátil que es usada en beneficio propio por patógenos como *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*. El oxalato es un ácido fuerte que acidifica el medio donde es liberado, estimulando la producción y la actividad de un amplio rango de enzimas secretadas por *B. cinerea* (Manteau *et al.*, 2003), como algunas de sus pectinasas (Kars *et al.*, 2005b; Manteau *et al.*, 2003), proteinasas (Manteau *et al.*, 2003; ten Have *et al.*, 2004) y lacasas (Manteau *et al.*, 2003). Por otra parte, el oxalato puede estimular la hidrólisis de la pectina por la acción de la poligalacturonasas debido a su fuerte actividad quelante para iones calcio. Cuando el ácido oxálico secuestra los iones Ca^{2+} de la pared celular, su estructura molecular se ve alterada, facilitando la acción de las pectinasas y haciendo que la matriz pectídica absorba agua y se hinche (Mansfield y Richardson, 1981). Por último, el oxalato puede reducir el choque oxidativo y las repuestas de defensa en los tejidos de la planta (Cessna *et al.*, 2000), a la vez que activa el programa de muerte celular. Mutantes de *S. sclerotiorum*, generados por luz ultravioleta, deficientes en la producción de ácido oxálico son no patogénicos (Godoy *et al.*, 1990), lo que hace pensar que en *B. cinerea* pudiera pasar lo mismo al compartir sistemas similares de infección.

4.1.e.4. Proteínas tóxicas

Además de metabolitos fitotóxicos, *B. cinerea* puede producir proteínas fitotóxicas, como las proteínas tipo NEP1 (Staats *et al.*, 2007a) y la Bcspl1, homóloga a proteínas Snodprot (Chagué *et al.*, 2006; Kunz *et al.*, 2006). Estas proteínas fitotóxicas son capaces de causar la muerte de las células del huésped mediante mecanismos apoptóticos y, en menor medida, mecanismos necróticos. De esta manera se puede apreciar que la infección de *B. cinerea* es provocada y requiere la activación de un programa de muerte celular en el huésped.

4.2. La infección requiere de una participación activa del huésped

El objetivo final de un patógeno necrotrofo no es matar al huésped, sino descomponer el tejido vegetal y convertirlo en biomasa del hongo, para lo cual necesita matar las células del huésped mediante compuestos tóxicos y enzimas líticas, o bien activando su programa de muerte celular. Muy contrariamente a lo que se pensaba hasta hace poco tiempo, las plantas juegan un papel mucho más

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

activo a la hora de determinar el establecimiento o no de una interacción con patógenos necrotrofos. Estudios recientes nos indican que es necesaria una interacción del patógeno para inducir la muerte de las células y de la planta para activar mecanismos de muerte celular o apoptosis. (Govrin y Levine, 2000; van Baarlen *et al.*, 2007).

Durante la penetración de la cutícula y la formación de lesiones primarias por parte de *B. cinerea*, ocurre un choque oxidativo tanto en la membrana plasmática de la planta como en la superficie de la hifa del hongo (Schouten *et al.*, 2002; Tenberge, 2004). Los procesos oxidativos que se producen en la zona de contacto entre el patógeno y el huésped (Deighton *et al.*, 1999; Muckenschnabel *et al.*, 2001a; Muckenschnabel *et al.*, 2002; Muckenschnabel *et al.*, 2003; Muckenschnabel *et al.*, 2001b; van Baarlen *et al.*, 2007) causan un cambio brusco en el equilibrio redox del tejido infectado, lo que desencadena la muerte celular del huésped, facilitando el progreso de la enfermedad (Lyon *et al.*, 2004). La superóxido dismutasa de *B. cinerea*, BcSOD1, capaz de producir H₂O₂, es secretada al medio externo de la hifa y se expresa desde el momento de la penetración de la cutícula. Mutantes en este gen manifiestan una reducción de la virulencia en múltiples huéspedes (Rolke *et al.*, 2004).

Este choque oxidativo que ocurre durante la respuesta de hipersensibilidad de la planta, confiere resistencia a patógenos biotrofos (Rivas y Thomas, 2005) al impedir el avance de la infección. En el caso de patógenos necrotrofos, como *B. cinerea*, la muerte de las células vegetales beneficia al patógeno y conduce a la susceptibilidad del huésped (Govrin y Levine, 2000). Por tanto, la habilidad de *B. cinerea* de inducir la muerte celular programada del huésped es crucial para el éxito de la infección.

El hecho de que plantas transgénicas que expresan proteínas antiapoptóticas presenten una mayor resistencia a *B. cinerea* (Dickman *et al.*, 2001) refuerza la importancia del papel que juegan los programas de muerte celular en la infección del hongo.

4.3. Evasión de los mecanismos de defensa de la planta

Durante el transcurso de la interacción entre *B. cinerea* y el huésped, la planta intenta enérgicamente evitar la invasión y el progreso de la enfermedad activando una multitud de rutas de defensa, como la producción de metabolitos antifúngicos y proteínas involucradas en patogénesis (van Baarlen *et al.*, 2004).

El ataque de *B. cinerea* sobre tomate y *Arabidopsis* induce la expresión de varios genes relacionados con rutas de defensa bajo el control del jasmonato (Benito *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001), etileno (Díaz *et al.*, 2002) o ácido salicílico. Rutas de defensa bajo el control de estas hormonas vegetales contribuyen a la resistencia basal hacia *B. cinerea*, ya que mutantes en estas rutas mostraron una mayor susceptibilidad a la enfermedad.

La planta también puede producir proteínas que inhiben la acción de poligalacturonasas fúngicas (Juge, 2006) mediante interacción física. La expresión de varias proteínas de esta familia en plantas transgénicas resultó en un aumento cuantitativo de la resistencia a *B. cinerea* (Agüero *et al.*, 2005; De Lorenzo y Ferrari, 2002; Ferrari *et al.*, 2003; Joubert *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2000).

Otros metabolitos antifúngicos de la planta a los que *B. cinerea* se debe enfrentar son fitoalexinas, como la camalexina (Kliebenstein *et al.*, 2005; van Baarlen *et al.*, 2007), la alpha tomatina (Quidde *et al.*, 1999) y transportadores del tipo ABC o MFS (de Waard *et al.*, 2006).

4.4. Mecanismos de señalización durante la infección

La infección de una planta huésped es un proceso altamente regulado en el cual el patógeno debe decidir qué hacer en cada momento. Cada fase de la patogénesis, como la germinación, el desarrollo de estructuras de infección (apresorios) o la producción de enzimas y metabolitos, debe ser correctamente orquestada. El patógeno debe percibir los cambios físicos y químicos que ocurren en el ambiente que le rodea y asegurar una apropiada respuesta celular. El fallo en cualquier paso de estas rutas de señalización, percepción y respuesta conducen a un crecimiento y a una diferenciación anormal. Por lo tanto, son de vital importancia para el éxito de la infección tanto los mecanismos de percepción como los de señalización y respuesta celular (Tudzynski y Schulze Gronover, 2004).

Existen en *B. cinerea* varias rutas de señalización que participan en distintos procesos fisiológicos del patógeno, entre los cuales se encuentran mecanismos relacionados con la patogénesis del hongo.

4.4.a. Ruta de señalización dependiente de AMPc

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

En *B. cinerea* encontramos varios componentes de esta ruta, como los tres genes que codifican las subunidades G α de las proteínas-G heterotriméricas BCG1, BCG2 (Gronover *et al.*, 2001) y BCG3 (Doehlemann *et al.*, 2006), el gen *bac* que codifica para una adenilato ciclasa (Klimpel *et al.*, 2002) y el gen que codifica la subunidad reguladora, (*bcpkaRk*) de la proteína kinasa dependiente de AMPc, PKA (Schumacher *et al.*, 2008b)

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

4.4.b. Ruta de señalización controlada por la MAP kinasa

Las MAP kinasas (“mitogen-activated protein kinase”) de hongos fitopatógenos son esenciales en las primeras fases de infección y en especial en la penetración de la superficie cuticular de la planta (Solomon *et al.*, 2005).

En *B. cinerea* se ha caracterizado un gen, *bmp1*, que codifica para un MAP kinasa homóloga a PMK1 de *M. grisea* (Xu, 2000), otra MAP kinasa, BcSAK1, homóloga a la proteína HOG1 de *Saccharomyces cerevisiae*, y BMP3, homóloga a Slr2 de *S. cerevisiae*.

4.4.c. Ruta de señalización dependiente de Ca²⁺/calmodulina

La calcineurina fosfatasa y la ciclofilina A son componentes altamente conservados en la ruta de señalización dependiente de Ca²⁺/calmodulina presentes en *B. cinerea* (Viaud *et al.*, 2003). Esta ruta se ve alterada por la acción de la ciclosporina A y de FK506 (Kraus y Heitman, 2003). También se han detectado genes que actúan en esta ruta, como *bcp1* y *bcp15*, así como el factor de transcripción CRZ1 y la fosfolipasa C (Schumacher *et al.*, 2008a).

4.4.d. Ruta de señalización de las proteínas GTPasas

Las GTPasas de tipo Ras y Rho de la superfamilia RAS normalmente juegan papeles que coinciden y se complementan en diferenciación y desarrollo celular de hongos filamentosos. *B. cinerea* posee dos proteínas de esta superfamilia RAS, BcRAS1 y BcRAS2 (Schumacher *et al.*, 2008b), además de BcRAC y BcCDC42, pertenecientes al tipo Rac (Boyce *et al.*, 2005), y BcRAB2, miembro de la subfamilia Rab.

4.5.e. Sensores y receptores

Los hongos responden a una gran cantidad de señales ambientales que regulan su desarrollo y metabolismo así como las interacciones con el huésped. Los receptores en la superficie de las células fúngicas detectan estas señales y las transmiten a vías intracelulares de señalización. Las familias de los receptores de proteínas tipo G (GPCRs) han atraído la atención de los investigadores y han sido ampliamente investigadas en hongos patogénicos (DeZwaan *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2005). En

B. cinerea se ha identificado un gen perteneciente a este tipo de proteínas, *btp1* (Gronover *et al.*, 2005). Aparte de las GPCR, el genoma de *B. cinerea* muestra 20 histidina kinasas de dos componentes, proteínas capaces de detectar señales extracelulares y adaptarse a su entorno, pertenecientes a 11 clases diferentes (Catlett *et al.*, 2003).

5. Estrategias experimentales para el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad en *B. cinerea*.

Desde que se transformara exitosamente *B. cinerea* (Hamada *et al.*, 1994), la Biología Molecular ha revolucionado el análisis de las estrategias de infección y patogenicidad en este patógeno. La gran cantidad de herramientas moleculares disponibles hoy día, tales como métodos de transformación, vectores, mutantes, genotecas... han posibilitado que un gran número de genes hayan sido caracterizados y su función analizada. El resultado de todos estos estudios, unido a la reciente secuenciación y estudio del genoma de *B. cinerea*, han hecho de este hongo un modelo de estudio en la fitopatología molecular.

5.1. Análisis por inactivación génica en *B. cinerea*

La herramienta fundamental utilizada para llevar a cabo un análisis funcional de los genes implicados en cualquier proceso biológico en un sistema vivo se basa en la obtención de mutantes en el gen o genes de interés y en la caracterización de dichos mutantes en comparación con el fenotipo del organismo tipo silvestre. Ello supone desarrollar estrategias experimentales que permitan alterar o inactivar la función del gen objetivo, y de procedimientos que permitan seleccionar los individuos derivados del proceso de mutagénesis. En la mayor parte de los casos los sistemas de trabajo se basan en la generación de determinados tipos de construcciones que luego serán introducidas en el organismo objeto de estudio mediante transformación.

Con este objeto se han desarrollado y descrito diferentes métodos para la transformación y el análisis de la función génica en *B. cinerea*, basándose unos en la obtención de protoplastos y el tratamiento posterior con PEG (Hamada *et al.*, 1997) y otros en la utilización del biosistema de *Agrobacterium tumefaciens* (Rolland *et al.*, 2003). Tanto en un caso como en el otro es necesario disponer de marcadores seleccionables, normalmente de resistencia a antibióticos, que permitan identificar las células transformadas.

5.1.a. Mutagénesis dirigida por disrupción génica

Para obtener mutantes por disrupción génica, un fragmento interno del gen seleccionado carente del codón de iniciación y de terminación, es insertado en un plásmido que contiene un fragmento,

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

denominado casete, con un marcador de selección de resistencia a un antibiótico flanqueado por una secuencia de iniciación y otra de terminación.

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

5.1.b. Mutagénesis dirigida por reemplazamiento génico

En este caso, las regiones flanqueantes del gen estudiado son insertadas a ambos lados de un casete con un marcador de selección por resistencia a antibiótico mediante clonación (van Kan *et al.*, 1997) o mediante extensión por PCR (Kars *et al.*, 2005b).

El hongo es transformado con la construcción linearizada que se integra mediante recombinación homóloga con un doble sobrecruzamiento en ambas regiones flanqueantes, lo que determina la sustitución del gen objetivo por el casete con el marcador de selección. Este método, usando regiones flanqueantes de entre 500 y 1000 pares de bases, se ha convertido en la técnica utilizada normalmente, al presentar un rendimiento muy superior (70-100%) al presentado cuando se transforma *B. cinerea* con un vector circular y se trata de determinar un solo evento de recombinación homóloga.

5.1.c. Mutagénesis aleatoria por inserciones de T-DNA

Agrobacterium tumefaciens es utilizado para transformar hongos (Michielse *et al.*, 2008), incluido *B. cinerea*, pudiéndose obtener buenas eficiencias de transformación (Rolland *et al.*, 2003). Los transformantes poseen una copia única de T-DNA que se ha insertado de manera aleatoria en el genoma. Procedimientos de este tipo harían posible la producción de una colección de cepas mutantes por inserción, como en el caso de *Arabidopsis* (Alonso *et al.*, 2003), que luego serían analizadas fenotípicamente tratando de identificar mutantes con un fenotipo de interés en los cuales resultaría factible, además, identificar el punto de inserción del T-DNA y, por tanto, el gen alterado. Esta estrategia, utilizada en algunas especies de hongos (Jeon *et al.*, 2007), no ha generado resultados de interés en el caso de *B. cinerea* (Tudzynski y Siewers, 2004).

5.1.d. Silenciamiento génico por ARN de interferencia

La técnica del silenciamiento se basa en la introducción de un transgen (generalmente un fragmento de pequeño tamaño del gen diana) con la consiguiente reducción de la expresión del gen endógeno mediante un sistema similar al RNA de interferencia de mamíferos o la cosupresión en plantas (Fulci y Macino, 2007). El silenciamiento génico se ha mostrado como una técnica muy efectiva en hongos patógenos de plantas (Kadotani *et al.*, 2003) y puede ser de gran interés en genes que son importantes en viabilidad o que son esenciales, ya que su expresión puede mantenerse a diferentes niveles. El silenciamiento simultáneo de múltiples genes es factible usando construcciones génicas quiméricas (Fitzgerald *et al.*, 2004). Estrategias de silenciamiento génico parcial o inducido (Patel *et al.*, 2008) pueden permitir examinar las consecuencias de la eliminación de los productos del gen, así como el análisis de familias génicas.

5.2. Métodos indirectos de análisis de la función génica en *B. cinerea*

Aunque la obtención de mutantes alterados en el proceso de infección sea la estrategia esencial y fundamental en el estudio de los factores de patogenicidad de *B. cinerea*, hay que tener en cuenta la naturaleza multinucleada de este hongo y la frecuente aparición y formación de micelios heterocariontes en la naturaleza. Estas características del patógeno pueden hacer que los métodos usados para la obtención de mutantes, por mutagénesis dirigida o por silenciamiento génico, resulten muy laboriosos y, en ocasiones, infructuosos. Además, puesto que la mayoría de los genes candidato “esperados” ya han sido analizados y estudiados en un mayor o menor grado, otras estrategias deben ser aplicadas para identificar otros factores que no se aprecian de manera tan directa y que pueden jugar un papel relevante en el proceso de infección. En la actualidad se están utilizando diversas estrategias para llevar a cabo estos estudios.

Por un lado, el uso de mutagénesis insercional aleatoria, que permite identificar posibles genes candidatos al observar los fenotipos obtenidos. Aunque la técnica REMI ha sido usada exitosamente en diversos hongos fitopatógenos (Balhadère *et al.*, 2007), parece que en *B. cinerea* no funciona del todo bien (Tudzynski y Siewers, 2004). Esto ha hecho que la transformación mediante *Agrobacterium* esté siendo utilizada en varios laboratorios con este mismo objeto, lo que ha generado una colección de mutantes con fenotipos diversos, de los cuales se han detectado algunos relacionados con virulencia (Williamson *et al.*, 2007).

Otra estrategia utilizada se basa en el estudio de los niveles de expresión de algunos genes durante ciertas etapas del desarrollo del hongo o durante el proceso de infección. Para llevar a cabo estas observaciones se utilizan diversas metodologías, como el análisis de la expresión diferencial

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

mediante técnicas basadas en RT-PCR (Benito *et al.*, 1996) o en hibridación sustractiva. La inminente disponibilidad de microarrays permitirá realizar estos estudios sobre todo la totalidad del genoma de *B. cinerea*.

Por último, no hay que olvidar que tanto el genoma de dos cepas de *B. cinerea*, cepa B05.10 y cepa T4, así como el genoma de la cepa 1980 de *S. sclerotiorum*, especie muy próxima filogenéticamente a *B. cinerea*, han sido secuenciados. La información derivada de estos tres proyectos de secuenciación ha sido liberada y está a disposición de la comunidad científica.

5.3. Análisis y caracterización funcional de genes expresados diferencialmente *in planta*.

Nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca - Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) está trabajando en la caracterización de los factores y mecanismos de patogenicidad de *B. cinerea*. Con el fin de profundizar en estos análisis, la aproximación experimental seguida se basa en la caracterización de genes del patógeno cuya expresión es inducida específicamente, o cuyo nivel de expresión aumenta significativamente, *in planta* durante la interacción con el huésped. Este trabajo se fundamenta en particular en los resultados obtenidos del estudio de expresión génica diferencial durante la interacción *B. cinerea*-tomate (Benito *et al.*, 1996).

5.3.a. Expresión diferencial mediante DDRT-PCR

En un principio, el análisis de la expresión génica diferencial se ha basado fundamentalmente en procedimientos de hibridación. En el análisis de las interacciones hongo patógeno-planta estos procedimientos se han utilizado satisfactoriamente en el aislamiento de genes codificantes de estructuras de infección y genes inducidos durante la patogénesis. Estos procedimientos, laboriosos, lentos y con una sensibilidad limitada, han sido sustituidos por procedimientos más precisos y con un nivel de sensibilidad cada vez más elevado que han conducido finalmente al establecimiento de procedimientos de análisis de expresión génica global basados en técnicas de hibridación con micromatrices de DNA o basados en la secuenciación masiva de cDNA derivados del conjunto de los RNA mensajeros que son transcritos en unas condiciones dadas. Uno de los procedimientos que fue desarrollado y aplicado con éxito en esta fase intermedia, que podemos considerar “puente”, ha sido aquél denominado DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription – PCR, o visualización diferencial de la expresión génica mediante transcripción reversa – PCR, en español). Este método es más rápido y presenta una sensibilidad mayor que aquellos primeros procedimientos, al estar basado en PCR. Debido a su mayor sensibilidad ha permitido el estudio y análisis de sistemas

en los que la cantidad de material biológico constituye una limitación, como ocurre en las etapas tempranas del proceso de infección.

La técnica de DDRT-PCR se basa en la obtención de fragmentos de cDNA mediante transcripción inversa y posterior amplificación mediante PCR a partir de los RNA mensajero que están presentes en un momento determinado en unas condiciones dadas en un tipo celular concreto o en un organismo de interés. La visualización de los fragmentos de cDNA amplificados ofrece una panorámica del conjunto de genes expresados en esas condiciones y en ese momento en ese organismo y resulta posible comparar los patrones de bandas y, por lo tanto, de expresión génica por ejemplo de un mismo organismo ante distintas condiciones ambientales, de un mismo organismos durante distintas fases de desarrollo o de distintos tipos celulares entre sí.

El procedimiento se basa en la utilización de una colección de cebadores Oligo-dT de 11 residuos de timidina con dos nucleótidos adicionales en su extremo 3' que son específicos de cada cebador. Cada uno de estos cebadores tiene una combinación particular y diferente en los dos últimos nucleótidos de su extremo 3': A, G o C en la penúltima posición y A, G, C o T en la última. Son posibles entonces ($3 \times 4 = 12$) combinaciones diferentes de nucleótidos en estas dos posiciones y surgen así 12 cebadores distintos. Estos cebadores son los cebadores reversos que se utilizan en la reacción de transcripción inversa mediante la cual se generan las correspondientes poblaciones de cDNA de una cadena correspondientes. La extensión de dos nucleótidos específicos en el extremo 3' de cada cebador reverso proporciona especificidad en el

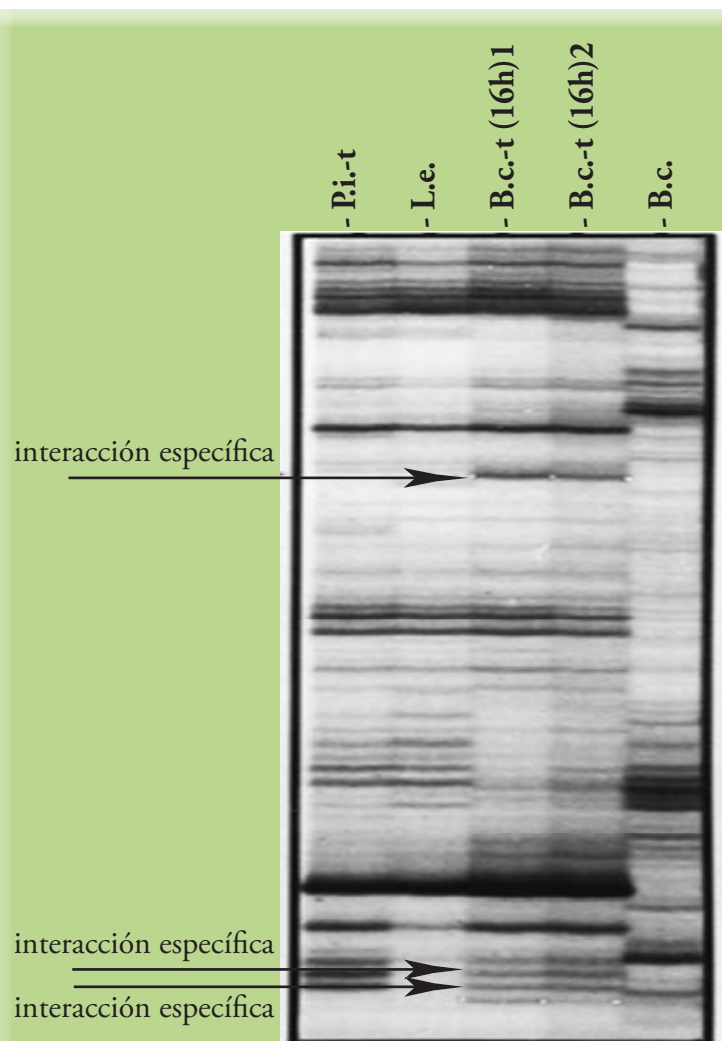


Figura 5.1 (Tomado de Benito *et al.*, 1996)
Gel representativo de un análisis mediante DDRT-PCR llevado a cabo utilizando como material de partida muestras de RNA mensajero derivado de:

- Interacción *P. infestans* - tomate (**P.i.-t**)
- hojas de tomate (**L.e.**)
- Interacción *B. cinerea* - tomate a las 16 horas (**B.c.-t**)
- *B. cinerea* cultivado *in vitro*

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

anillamiento del cebador y sólo aquellos RNA mensajeros que presentan inmediatamente antes de la cola de poliA la secuencia de dos nucleótidos complementaria a los dos nucleótidos específicos de cada cebador reverso servirán de molde en la reacción de transcripción inversa. Puesto que se trabaja con 12 cebadores reversos distintos, en conjunto se generan 12 subpoblaciones de cDNA diferentes, cada una de las cuales deriva de una población de RNA mensajero que representa e incluye aproximadamente una duodécima parte del total de RNA mensajero presentes en la muestra original. Este paso de síntesis de cDNA en 12 reacciones de transcripción inversa independientes con cada uno de los 12 cebadores reverso diferentes es crucial en el desarrollo del procedimiento de DDRT-PCR, ya que permite subdividir la población original de RNA mensajero en 12 subpoblaciones de menor tamaño y subdividir, a su vez, el número total de bandas que pueden aparecer en las reacciones de PCR posteriores en cada caso, permitiendo su resolución en geles de acrilamida.

En una segunda fase, el procedimiento se basa en la realización de una serie de reacciones de PCR que se llevan a cabo utilizando como molde cDNA derivado de cada reacción de síntesis de cDNA. En cada reacción se utilizan como cebadores por una parte el mismo cebador reverso utilizado en la reacción de síntesis de cDNA y un cebador de pequeño tamaño, generalmente un decámero, de secuencia aleatoria (con un contenido G+C de 50%). La reacción de PCR se lleva a cabo en condiciones de baja temperatura de anillamiento para permitir el anillamiento de cebadores de pequeño tamaño y en presencia de un dNTP marcado radiactivamente. Los productos de amplificación se resuelven en un gel de acrilamida y se detectan mediante autoradiografía.

Para llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial se aplica todo el procedimiento experimental exactamente en las mismas condiciones (en paralelo) pero partiendo de muestras de RNA mensajeros derivadas de las distintas situaciones experimentales objeto de estudio. Finalmente se comparan los patrones de bandas obtenidos con cada combinación de cebadores en todas las muestras de interés tratando de identificar aquellas bandas que puedan resultar específicas de unas condiciones dadas. Estas bandas representan fragmentos de cDNA derivados de genes que se expresan diferencialmente en el juego de condiciones que están siendo analizadas.

En nuestro laboratorio estamos aplicando esta aproximación al análisis de la interacción *B. cinerea*-tomate, concretamente al análisis de los mecanismos que son activados específicamente durante los estadios iniciales de la interacción (reconocimiento del huésped y penetración) y durante la formación de lesiones dispersivas. Para su estudio se ha establecido, en primer lugar, un sistema de inoculación artificial que proporciona eficiencias de infección elevadas y resultados reproducibles (Benito *et al.*, 1998). Disponiendo de material infectado, se ha iniciado la comparación, mediante “differential display”, de los patrones de expresión del hongo y de la planta durante la interacción en las fases indicadas con los patrones de expresión tanto del hongo durante su crecimiento saprofito como de la planta sana. Para distinguir entre los genes del hongo que se expresan diferencialmente durante la interacción y los genes de la planta que se expresan en respuesta al patógeno se han incluido en este análisis comparativo los patrones de expresión de la planta infectada con otros

patógenos característicos (*Phytophthora infestans* y el Virus de la Necrosis de Tabaco). Este análisis ha permitido aislar varios fragmentos de cDNA derivados de genes de *B. cinerea* cuya expresión es específicamente inducida *in planta* o cuyo nivel de expresión aumenta significativamente durante la interacción (Benito *et al.*, 1996). La Figura 6.1 muestra un ejemplo representativo de los gels de acrilamida obtenidos en el que las fechas identifican fragmentos de cDNA presentes en las carreras derivadas de muestras obtenidas de hojas de tomate infectadas con *B. cinerea* pero no en muestras derivadas de hojas no infectadas y de micelio de *B. cinerea* cultivado *in vitro*. Son estas las bandas seleccionadas para su posterior análisis.

5.3.b. Señales detectadas y genes expresados en la interacción *B. cinerea*-tomate

El análisis mediante DDRT-PCR de la interacción *B. cinerea*-tomate permitió detectar varios fragmentos de cDNA derivados de genes de *B. cinerea* cuya expresión es inducida específicamente *in planta* durante la interacción del hongo con tomate, lo que hace suponer que los productos génicos asociados a estos fragmentos estarán implicados en el proceso de infección. Dos fragmentos obtenidos, y sus genes asociados, constituyen el objeto de este trabajo.

5.3.b.1. Fragmento ddB-2

El fragmento ddB2 (número de acceso Genbank Z70214) presenta 265 pares de bases. Mediante hibridaciones tipo northern se comprobó que el gen codificador del RNA mensajero a partir del

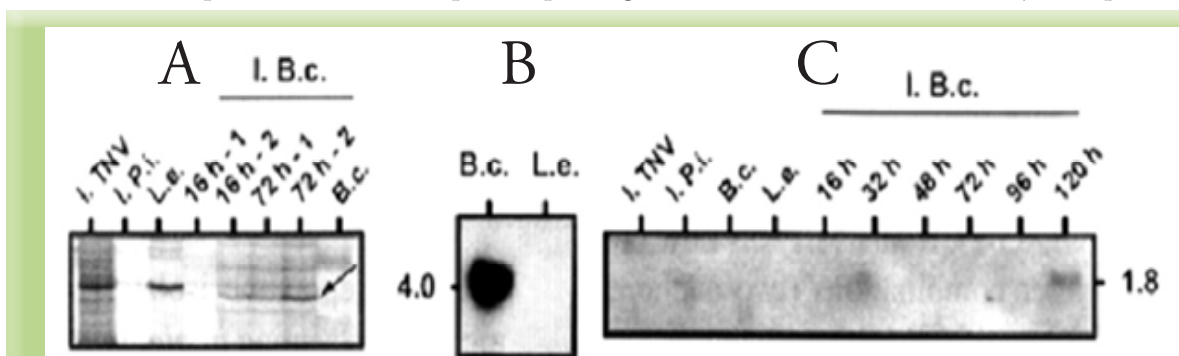


Figura 5.2 (Tomado de Benito *et al.*, 1996)

Análisis de expresión mediante Northern blot utilizando como sonda el fragmento ddB2 marcado radiativamente sobre muestras de RNA total (20ug en cada carrera) derivados de hojas de tomate infectadas con *P. infestans* (i.P.i.), de hojas de tomate infectadas con TNV (i. TNV), hojas de tomate (L.e.), *B. cinerea* derivada *in vitro* (B.c.) y hojas de tomate infectadas con *B. cinerea* y recogidos a distintos tiempos después de la inoculación I.B.c. (16h a 120h).

A: Area del gel de DDRT-PCR donde se detecta el fragmento ddB2 (flecha).

B: Southern blot con 5 mg de ADN genómico de *B. cinerea* (B.c.) y de tomate (L.e.) digeridos con *Hind*III e hibridado con el fragmento ddB2 marcado radiativamente.

C: Northern blot del fragmento ddB2 (20 µg ARN).

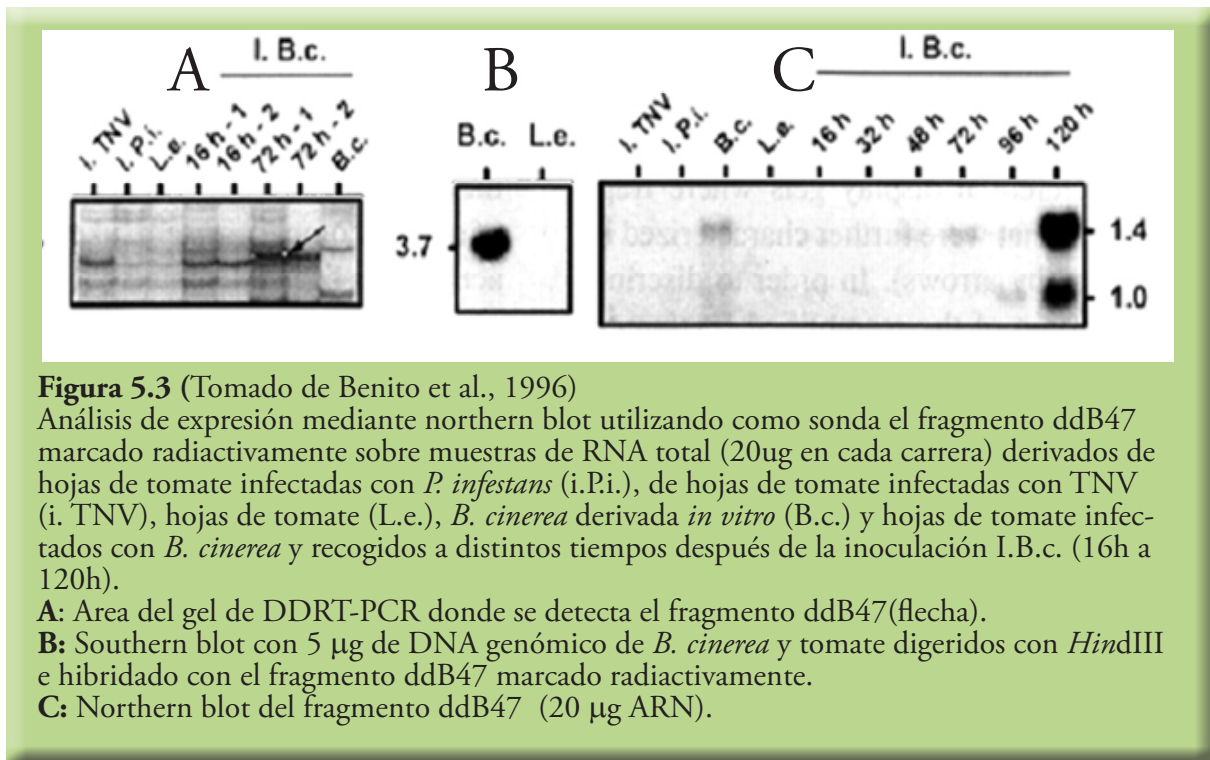
Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

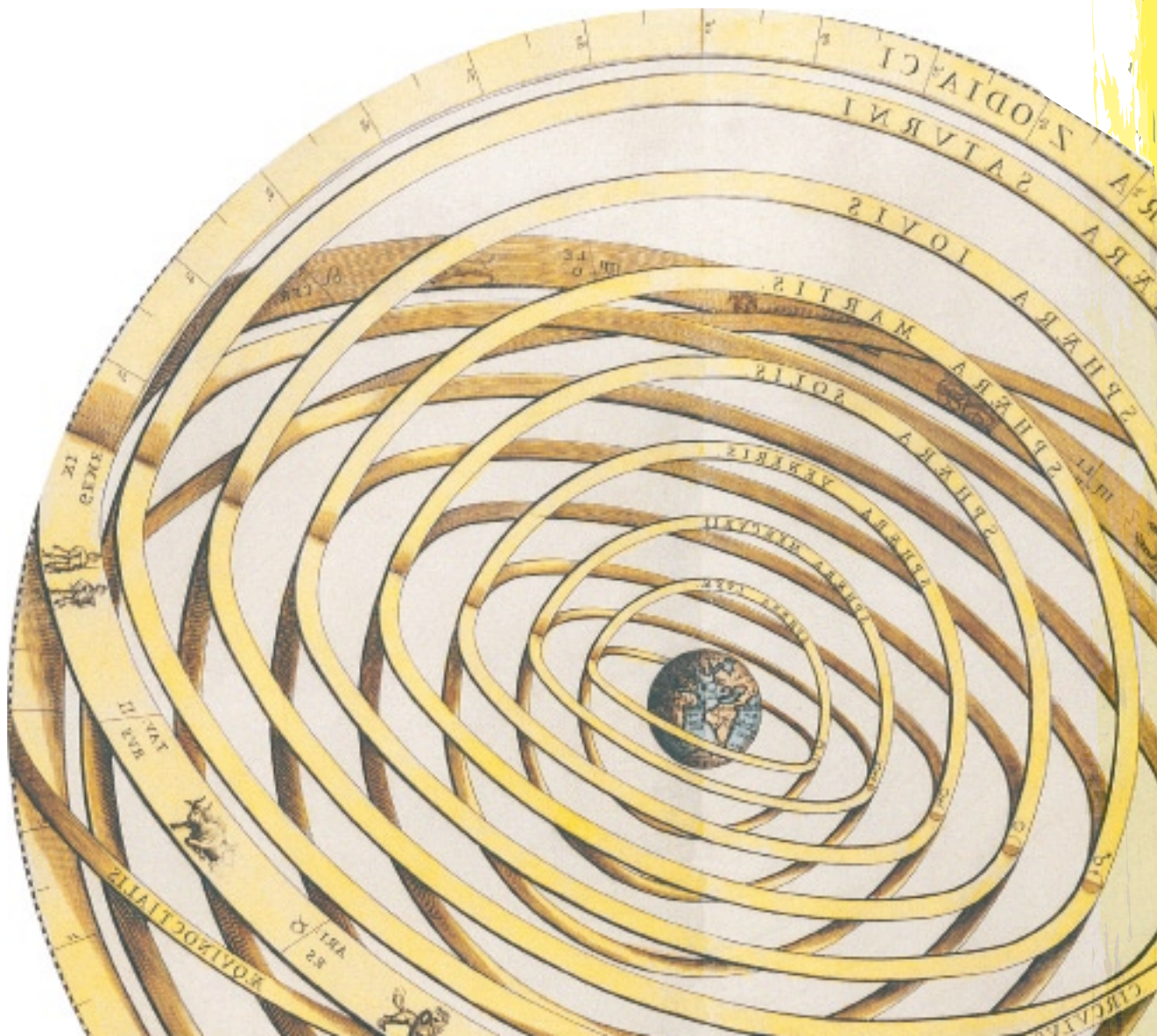
cual se ha derivado el fragmento de cDNA ddB2 tiene un tamaño de 1,8 kb aproximadamente y se expresa únicamente en estadios tardíos del proceso de infección, concretamente durante la fase de colonización y maceración del tejido infectado. Su expresión no es detectable *in vitro*.

5.3.b.2. Fragmento ddB-47

El fragmento ddB47 (número de acceso Genbank Z71215) presenta 222 pares de bases. La hibridación realizada con el fragmento ddB47 permite detectar dos RNA mensajeros de tamaño diferente, el primero con un tamaño estimado de aproximadamente 1,4 kb y el segundo con un tamaño estimado aproximado de 1,0 kb. Presentan un patrón de expresión transitoria, con máximos de expresión en las fases de penetración, formación de lesiones dispersivas y colonización del tejido infectado, y son inducidos en gran medida *in planta*.



Objetivos



1. Aislamiento, identificación y clonación de los genes de los que derivan los fragmentos de cDNA ddB2 y ddB47 obtenidos mediante DDRT-PCR en *B. cinerea*.
2. Análisis de la expresión de los genes de los que derivan los fragmentos de cDNA ddB2 y ddB47 de *B. cinerea* durante el crecimiento saprofítico y durante la interacción planta-patógeno.
3. Caracterización estructural de los genes de los que derivan los fragmentos de cDNA ddB2 y ddB47.
4. Obtención de mutantes de *B. cinerea* deficientes en el gen o genes de los que derivan los fragmentos de cDNA ddB2 y ddB47 mediante técnicas de reemplazamiento génico.
5. Caracterización fisiológica de los mutantes de *B. cinerea* deficientes en el gen o genes codificadores de los fragmentos ddB2 y ddB47: crecimiento saprofítico y crecimiento *in planta*.

Materialles y Métodos



6. Organismos

6.1. Plantas

Las plantas usadas para los experimentos de inoculación son:

- Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Roma, cultivadas y cedidas por los Doctores Pablo Benavides y José Luis Palomo del Centro de Diagnóstico de Aldearrubia, Salamanca, de la Junta de Castilla y León.
- Judía (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en los invernaderos del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE)

6.2. Hongos

La cepa tipo silvestre de *B. cinerea*, B05.10, fue obtenida en el laboratorio del Profesor Paul Tudzynski (Wilhelms Universität Münster, Alemania) (Büttner *et al.*, 1994). Se trata de una cepa haploide ampliamente caracterizada en diversos laboratorios y obtenida mediante el tratamiento con benomilo (Quidde *et al.*, 1999) de la estirpe de referencia SAS56 (Faretra *et al.*, 1988).

Además de la cepa tipo silvestre (TB05.10) se utilizaron las cepas mutantes alteradas en los genes a estudiar y las cepas regenerantes obtenidas a partir de protoplastos no transformados.

6.3. Bacterias

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

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

6.4. Virus

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

7. Medios y condiciones de cultivo

7.1. Plantas

Las plantas de tomate fueron cultivadas en vermiculita (Projar, SA) previamente esterilizada mediante dos ciclos de autoclave de 60 minutos de duración, en el invernadero del Centro de Diagnóstico de Castilla y León (Aldearrubia, Salamanca) durante 8 semanas, a una temperatura de 22 °C, con un régimen de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y riegos periódicos añadiéndose fertilizante cada siete días. Las plantas de judía se cultivaron en las mismas condiciones sembrando las semillas directamente en sustrato comercial estéril y creciendo las plantas durante 4-5 semanas antes de su utilización.

7.2. Hongos

El cultivo del hongo se realizó en medio líquido o sólido dependiendo del micelio que requería el experimento.

7.2.a. Cultivo en medio líquido de *B. cinerea*.

El medio estándar usado para el cultivo de *B. cinerea* en medio líquido fue el medio B5 que contiene sales Gamborg's B5 con vitaminas (AppliChem GMBH, Germany) (3,17 g/l) suplementado con 10 mM Sacarosa y 10 mM KH_2PO_4 con un pH 6. El medio fue inoculado rutinariamente con 5×10^5 conidios ml^{-1} (esporas/ml), mantenido a temperatura ambiente sin agitación por una hora para favorecer la sincronización en la germinación e incubado posteriormente a 22 °C con agitación a 180 rpm. Alternativamente se utilizó extracto de malta – ME (Difco Laboratorios, MD, USA) al 1% cuando se necesitó un medio más rico para determinar un desarrollo del hongo más rápido o para obtener micelio para la preparación de protoplastos.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

7.2.b. Cultivo en medio sólido de *B. cinerea*.

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

Para el análisis del crecimiento saprofítico se utilizaron placas de medio Malt Extract Agar - MEA (Difco Laboratorios, MD, USA) y de medio B5 sólido compuesto por sales Gamborg's B5 con vitaminas (AppliChem GMBH, Germany), 10 mM Sucrosa, 10 mM KH_2PO_4 pH 7 y 2% agar.

La selección de transformantes resultado de la transformación de *B. cinerea* se realizó utilizando el medio MEA al que se añadió, una vez esterilizado en el autoclave, 70 µg/ml de higromicina (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany) para la primera selección y 50 µg/ml de higromicina para las réplicas posteriores.

7.3. Bacterias

E. coli fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) líquido (0,5% de extracto de levadura (Difco), 1% de bacto triptona (Difco) y 1% de NaCl) o sólido (0,5% de extracto de levadura (Difco), 1% de bacto triptona (Difco), 1% de NaCl y 2% de agar). La temperatura de incubación fue 37 °C y en el caso de cultivo en medio líquido se aplicó agitación a 180-220 rpm. Cuando fue requerida la selección de colonias utilizando la resistencia a antibióticos, se añadieron, después de esterilizar el medio LB en el autoclave, 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) esterilizada por filtración. Cuando se llevaron a cabo infecciones con bacteriófagos, el medio LB fue suplementado con 0,2% maltosa y 10 mM MgCl_2 para favorecer la infección.

7.4. Bacteriófagos

Los fagos se conservaron a 4 °C en tampón de fagos (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO_4). La bacteria utilizada como hospedador fue la cepa de *E. coli* LE392, que fue cultivada

Materiales y Métodos

en medio LB suplementado con 0,2% maltosa y 10 mM MgCl₂ a 37 °C en agitación a 180-200 rpm hasta lograr una OD₆₀₀ de 0,6. Se mezclaron 100 µl de diluciones de fagos con 100 µl del cultivo de bacterias y se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. La suspensión de bacterias-fagos se mezcló con 3 ml de top-agar compuesto por LB, 10 mM MgSO₄, 0,2% maltosa y 0,7% de agarosa, precalentado a 50 °C. Inmediatamente después de mezclarlos suavemente se vertieron sobre placas de LB las cuales se dejaron solidificar sobre una superficie equilibrada y fueron incubadas a 37 °C durante una noche o hasta observar halos de infección.

8. Manipulación de *B. cinerea*

8.1. Recolección de conidios de *B. cinerea*

La recolección de esporas se realizó en una campana de flujo laminar para garantizar las máximas condiciones de esterilidad. Sobre placas esporuladas de *B. cinerea* se añadieron 10 ml de una dilución $5 \times 10^{-4} \%$ de Tween20 (P5927 SIGMA St. Louis, MO, USA) y se frotó suavemente la superficie de la placa con un asa de siembra para favorecer la liberación de los conidios en la suspensión de Tween20. Posteriormente, se recogió la suspensión con una pipeta y se depositó en un embudo con lana de vidrio en su parte más estrecha utilizado como filtro de micelio. La suspensión de esporas fue transferida a un tubo de centrifugación de 50 ml. Se repitió de nuevo la operación con agua MilliQ estéril para recoger los conidios que pudieran haber quedado sobre la placa petri.

La suspensión de conidios se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 40 ml de agua MilliQ estéril, se resuspendieron los conidios mediante agitación vigorosa y se volvió a centrifugar la suspensión a 1.000 rpm por 10 minutos. Este proceso de lavado se repitió dos o tres veces. El último lavado se realizó a 750 rpm para sedimentar los macroconidios y poder eliminar los microconidios que quedan en suspensión. Finalmente, después del último lavado, las esporas fueron resuspendidas en 10 ml de agua destilada estéril.

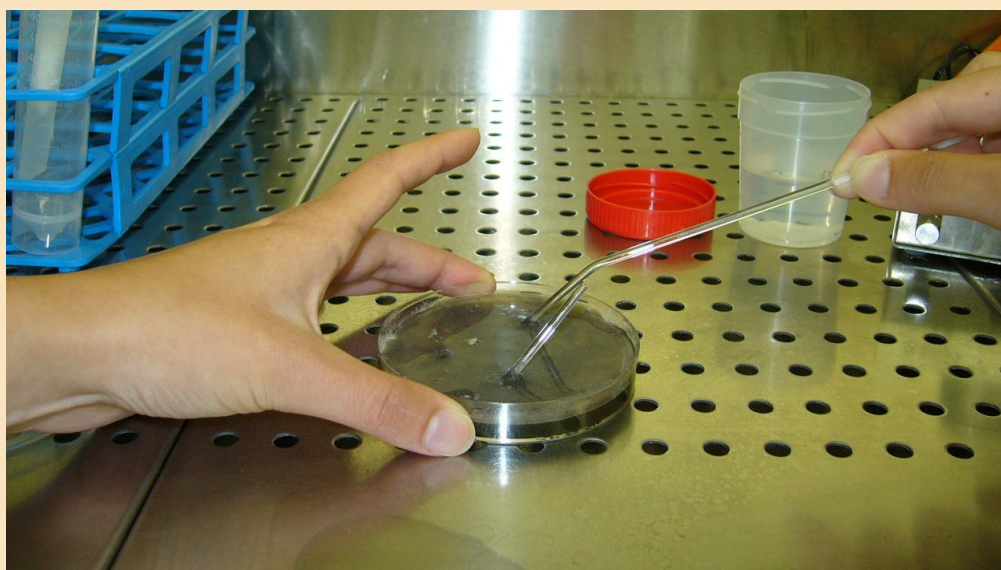


Figura 8.1

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

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Se procedió a la determinación del número de esporas en cámara Thoma mediante la recogida de una alícuota de la suspensión de esporas resultantes que se diluyó (1:10, 1:100 y 1:1000). La concentración de esporas fue calculada teniendo en cuenta las características de la cámara Thoma utilizada, las repeticiones realizadas y el factor de dilución aplicado.

8.2. Conservación de aislados

Una vez recolectados y lavados los conidios, éstos fueron almacenados a 4 °C en agua estéril durante 7 a 10 días para su uso en fresco. Para una conservación a largo plazo, la suspensión de esporas se conservó en 15% glicerol (Panreac Química, S.A.) a -80 °C. Para periodos de tiempo corto (hasta 3 meses), se puede conservar el hongo esporulado en placas de medio sólido, selladas con Parafilm “M” (American National Can), a 22 °C.

8.3. Obtención de cultivos monospóricos

Para la obtención de cultivos monospóricos de los aislados de interés, éstos fueron cultivados en placas con medio MEA. Se recogieron conidios de cada una de ellas y se determinó su concentración, sembrándose a continuación 100 esporas en cada placa e incubándose posteriormente durante 16 horas a 22 °C. Con la ayuda de una lupa binocular y de una aguja enmangada estéril se transfirieron individualmente los conidios germinados, es decir, aquellos que presentaban tubo germinativo, a placas de MEA (5 a 7 conidios/placa). A las 72 horas se hicieron réplicas ya individualizadas de las colonias transfiriendo pedacitos de agar con micelio del borde de crecimiento a placas nuevas de medio de cultivo PDA. De cada aislado se eligieron los tres derivados monospóricos que presentaban un mejor crecimiento y se transfirieron a placas individuales de PDA-tomate, para favorecer una rápida esporulación. En el caso de aislados transformados y elegidos por selección por resistencia a antibiótico, se realizaron entre 5-7 réplicas sucesivas a placas de medio con el antibiótico en cuestión, antes de proceder a la esporulación, para enriquecer en núcleos transformados el aislado seleccionado.

9. Estudio del fenotipo en *B. cinerea*

9.1. Ensayos de crecimiento saprofito

Una suspensión de 1×10^5 esporas/ml en agua destilada estéril fue utilizada como stock inicial de las cepas de *B. cinerea*. El medio de cultivo fue MEA o B5 sólido según las necesidades de cada experimento.

En el centro de cada placa petri se depositó una gota de 5 μ l de la suspensión de conidios para obtener 500 esporas totales. Por cada cepa se sembraron 4 placas para obtener un número de repeticiones estadísticamente significativo.

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

9.2. Ensayos de infección en planta

9.2.a. Caracterización fitopatológica

El análisis del grado de infección de cepas de *B. cinerea* se realizó según Benito *et al.* (Benito *et al.*, 1998). En primer lugar se preparó una suspensión de conidios (1×10^5 esporas/ml) de cada aislado a analizar en los medios B5 Gamborg's Salts y en Potato Dextrose Broth preparado a mitad de la concentración indicada por el fabricante (PDB $\frac{1}{2}$) y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente.

Mientras los conidios reposaban, se preparó el material vegetal a infectar. Se eligieron hojas de plantas de tomate de 7-8 semanas de edad y en el caso de la judía de plantas de 2 semanas de edad. Se cortaron las hojas y se insertaron por el peciolo en bloques de material inerte y absorbente (espuma de floristería) previamente saturado en agua y colocados sobre placas petri con agua. Esta estructura se dispuso en bandejas de plástico en cuya base se colocó papel absorbente humedecido y una rejilla de plástico que permitiera una separación entre el papel húmedo y las hojas inoculadas. Con trozos de poliestireno se elevaron las hojas o folíolos que entraban en contacto con la rejilla y papel humedecidos, como se puede observar en la Figura 9.1.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador



Figura 9.1

Sistema de infección en hojas de tomate, donde se observan la bandeja, el papel humedecido, la rejilla y la espuma de material inerte humedecida donde se asientan las hojas de tomate.

Se inocularon sobre las hojas gotas de 5 μ l con 500 conidios. Se dejaron secar durante 30-60 minutos a temperatura ambiente y se selló la parte superior de las bandejas con una película de plástico para crear unas condiciones de alta humedad relativa (HR). Las bandejas se mantuvieron durante 48 horas en germinadores a una temperatura de 22 °C, 80% HR y 16 horas de fotoperiodo.

Para el análisis del proceso de infección, la agresividad de los distintos aislados analizados se evaluó cuantificando dos parámetros diferentes: en primer lugar estimando el porcentaje de lesiones dispersivas producidas, y en segundo lugar el diámetro medio de las lesiones dispersivas producidas y el progreso de la infección en cada caso. Las lesiones dispersivas que presentaran un diámetro igual al de la gota de inoculación (unos 3 mm) se consideraban lesiones necróticas o nulas.

9.2.b. Obtención de material infectado para la extracción de DNA y RNA

Para la obtención de material infectado se utilizó el modelo tomate-*B. cinerea* (Benito *et al.*, 1998). Se preparó una suspensión de 10^5 esporas/ml que se inocularía en hojas de tomate preparadas en bandejas como se ha descrito en el apartado anterior.

La inoculación se realizó por medio de un spray que contenía la suspensión de esporas y que creaba una red de pequeñas gotas sobre la superficie de la hoja. El spray estaba impulsado gracias a la presión ejercida por una botella de N_2 . Las muestras se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente y se cubrieron por una lámina de plástico. Después se incubaron a 22 °C, 80 % HR y 16 horas de fotoperiodo. Las hojas se recogieron a las 8, 12, 16, 32, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inoculación de las hojas (hpi), congelándolas en nitrógeno líquido y conservándolas a -80 °C.

9.3. Estudios de microscopía

Para la observación microscópica de *B. cinerea*, tanto del tipo silvestre como de los transformantes y mutantes originados en este trabajo, se utilizó diverso equipamiento óptico. Dependiendo del objetivo del estudio se utilizó distintos tipos de óptica.

9.3.a. Microscopía óptica

Para el estudio y la manipulación de conidios y de micelio se trabajó siempre en el rango de luz visible, utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMLB y una lupa binocular Leica MZ95. La lupa se utilizó también para observar el grado de maduración del micelio en la recolección de conidios, así como para la detección de placas contaminadas con otros hongos y/o ácaros, y proceder a su eliminación.

9.3.b. Microscopía confocal

Para los estudios que comprendían el uso de pigmentos fluorescentes, como el MitoTracker Red, o de proteínas quimioluminiscentes, como la GFP, se procedió al uso de un microscopio confocal laser Zeiss LSM 510. Este microscopio está contruido sobre 3 láseres individuales (Ar, HeNe 543, HeNe 633) que permiten la observación en longitudes de onda de 458, 488, 514, 543, 568 y 633 nm.

La fluorescencia verde originada por la activación de la GFP se pudo observar a unos niveles de excitación de 470-490 nm y de emisión a 515-550 nm.

9.3.c. Tinciones

Para la localización subcelular de mitocondrias en conidios y micelio de *B. cinerea* se utilizó MitoTracker® Red CMXRos (M-7512, Invitrogen, USA) (Poot *et al.*, 1996). Esta molécula, que se utiliza en el estudio funcional y estructural de mitocondrias con el apoyo de microscopia de fluorescencia y confocal (Bkaily *et al.*, 1997), es un colorante fluorescente-rojo que tiñe las mitocondrias en células vivas y su acumulación depende del potencial de membrana. Se procedió con 50 ml de cada muestra que se tiñeron a una concentración final de 200 nM durante 20 minutos a 22 °C. Una gota de 10 µl de la suspensión de esporas se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio confocal. La fluorescencia roja debida a la tinción MitoTracker se observó en unos niveles de excitación a 545-580 nm y de emisión a 600 nm.

Para la observación en microscopios de luz visible no se utilizaron pigmentos ni tinciones, ya que la observación de conidios y micelio de *B. cinerea* es posible sin el uso de colorantes.

10. Herramientas y procedimientos moleculares

10.1. Extracción de ácidos nucleicos

10.1.a. DNA genómico de *B. cinerea*

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

10.1.a.1. Método estándar

Se parte de pasta de micelio derivada de un cultivo en medio B5 en agitación durante 16 horas, recogido por sedimentación y secado entre piezas de papel secante. Esta pasta fue marcada y sumergida en nitrógeno líquido pudiendo ser almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un posterior procesamiento.

Unos 200 mg de la pasta de micelio congelado fueron depositados en un mortero y molidos en presencia de nitrógeno líquido. Se añadieron 700 μl de tampón TES (100 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 2% SDS) al mortero y se descongeló el polvo del micelio mezclándolo suavemente para conseguir una suspensión homogénea. 500 μl de la suspensión fueron apartados a un tubo de 1,5 ml al cual se añadieron 5 μl de proteinasa K [20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] y que se incubó durante 60 minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se ajustó entonces la concentración de sales (NaCl) a 1,4 M con 140 μl de 5M NaCl y se añadieron 1/10 volúmenes de 10% CTAB. Se incubó toda la mezcla durante 10 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transcurrido este tiempo, se añadió 1 volumen de SEVAG (cloroformo:isoamílico 24:1) y el volumen resultante se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó posteriormente la mezcla a 10.000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a dos tubos de 1,5 ml, dividiendo la extracción en dos tubos con aproximadamente 700 μl de muestra en cada tubo.

Posteriormente, se añadieron 112,5 μl de 5 M acetato amónico ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) a cada tubo, se mezclaron suavemente y se incubaron los tubos en hielo durante al menos 30 minutos.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Después se centrifugaron a 12.000 rpm, a 4 °C y durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, desechándose el resto.

En este momento se añadieron 10 µl de RNAsa (R4875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 10 µg/µl a cada uno de los tubos y se prolongó la incubación a 37 °C durante 1 hora.

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

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

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

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

10.1.a.2. Método rápido

En este método el material de partida es micelio aéreo crecido en medio sólido que es recogido raspando la superficie de la placa de cultivo con un bisturí, teniendo cuidado de no arrastrar restos de agar. Para extraer DNA genómico se depositan unos 100-200 mg de micelio en un tubo de 1,5 ml conteniendo 300 mg de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro.

Se añadieron 500 µl de Tampón de Extracción (100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA y 3% SDS). El micelio se molió entre bolas de vidrio con ayuda de una varilla de vidrio, se agitó fuertemente en el vórtex y se incubó a 60 °C durante 5 minutos.

Después de una centrifugación a 10.000 rpm de 2 minutos, el extracto recuperado se calentó a 80 °C durante 10 minutos, se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos y se extrajo el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml.

Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló, se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos y se extrajo la fase acuosa transfiriéndola cuidadosamente a un nuevo tubo de tipo Eppendorf de 1,5 ml.

El DNA fue precipitado añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugando a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 minutos. Después se lavó con etanol 70%, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó en un speedvac. Se añadieron, finalmente, 25 µl de agua MiliQ para resuspender el precipitado de ácido nucleico y se almacenó a -20 °C.

10.1.b. ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN plasmídico multiplicado en *E. coli* se utilizaron distintos procedimientos experimentales, eligiéndose uno u otro en función de las necesidades particulares en cada caso.

10.1.b.1. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

E. coli transformada con un plásmido portador de resistencia a ampicilina fue cultivada en 5 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina durante una noche. El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de solución I (50 mM glucosa, 25 mM TRIS-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8). Se resuspendió el precipitado de células y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 200 µl de solución II (0,2 N NaOH y 1% SDS). Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 minutos. La extracción se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 150 µl de 3 M acetato sódico pH 5,2. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 minutos de nuevo. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo, desechándose el resto.

Un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) fue añadido a la extracción y se agitó en el vórtex durante 30 segundos. Después las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa a un nuevo tubo, eliminándose el resto. Se añadieron 2,5 volúmenes de 100% etanol y se centrifugó a 12.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos, desechándose el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 200 µl 70% etanol, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se desecó en el Savant DNA120 SpeedVac (Thermo Fisher Scientific Inc.). Finalmente el precipitado de ácido nucleico se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ estéril.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

10.1.b.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico

Se incubó *E. coli* en 100 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) durante una noche hasta obtener crecimiento exponencial. Se centrifugó en dos tubos de 50 ml a 3.000 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM TRIS-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8) a cada tubo y se resuspendió el precipitado. Una vez resuspendidas las células, se transfirió la extracción a tubos de 50 ml de ultracentrífuga y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 10 ml de solución II (0,2 N NaOH y 1% SDS) a cada tubo, se mezcló y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 7,5 ml de 3 M acetato sódico a cada tubo, se incubó 20 minutos en hielo y se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante en nuevos tubos de ultracentrífuga, se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol (16,5 ml) para precipitar el DNA, se incubó de varias horas a una noche a 4 °C, se centrifugó a 20 °C a 10.000 rpm durante 10 minutos en la supercentrífuga y se desechó el sobrenadante.

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

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

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

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

Se añadieron 1/10 volúmenes de 3 M acetato sódico (40 µl) y 2,5 volúmenes de etanol 100 % (1ml), se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó

con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se eliminó el etanol residual en un SpeedVac y finalmente el DNA se resuspendió en 200 µl de agua MilliQ.

10.1.b.3. Utilización de un kit comercial para la purificación de ADN plasmídico

Cuando se necesitó obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico con un grado de limpieza superior para determinadas aplicaciones específicas tales como secuenciación, se utilizó el kit comercial FastPlasmid (Eppendorf) siguiendo las recomendaciones de uso indicadas por el proveedor. Este método proporciona ADN plasmídico de gran pureza sin necesidad de llevar a cabo extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

10.1.c. ADN de bacteriófagos

Para el aislamiento de DNA de fagos se utilizó el kit “Lambda mini” (Qiagen). Los fagos fueron recogidos incubando 3 ml de tampón de fagos (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) en placas con halos de lisis confluentes durante 2-4 horas a temperatura ambiente o a 4 °C toda la noche con agitación. El tampón con los fagos y los lisados celulares se recogieron en un tubo de 50 ml para ultracentrífuga y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadió 0,3% de cloroformo para permitir la conservación de los fagos si fuera necesario. Se añadió 1 µl RNAsa (10 µg/µl enzima, 10 mM acetato sódico, 100 mM Tris-HCl pH 7,4) y 5 µl DNAsa (2 µg/µl enzima, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) para eliminar los ácidos nucleicos bacterianos. Posteriormente por medio del kit de Qiagen se extrajo el ADN del fago siguiendo las recomendaciones de utilización indicadas por el proveedor.

10.1.d. Extracción de ARN total de *B. cinerea*

Para la extracción de RNA total se siguió el método basado en la utilización del producto “TRI reagent” (Chomczynski, 1993) manufacturado por la empresa Molecular Research Center INC, que ha resultado ser mejor, tanto cuantitativamente como cualitativamente, en la extracción de RNA frente a otros métodos utilizados.

Se tomaron 100 mg de micelio congelado y se pulverizan en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Se añadió 1 ml de TRI reagent y se recogió el homogenado en dos tubos de 1,5 ml. Posteriormente se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

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

Se añadió 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 12.000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo. Se repitió de nuevo la extracción. El volumen final de muestra, procesada desde un principio en dos tubos de tipo eppendorf, se unió en un mismo tubo. A continuación, 0,55 volúmenes de isopropanol fueron añadidos a cada tubo (550 μ l), dejándolos reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugándolos posteriormente a 12.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con 1 ml etanol 70%, se centrifugó a 12.000 g y a 4 °C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El etanol residual se evaporó en un SpeedVac.

El RNA se disolvió en 200 μ l de agua MilliQ estéril con 1% DEPC y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente se dejó en hielo y se midió la concentración mediante un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

10.2. Vectores de clonación

10.2.a. pGEM-T y PGEM-T easy

Los vectores pGEM-T y pGEM-T Easy son plásmidos utilizados en la clonación de fragmentos de PCR. Estos vectores fueron proporcionados en forma de Kit comercial por la casa Promega. Se

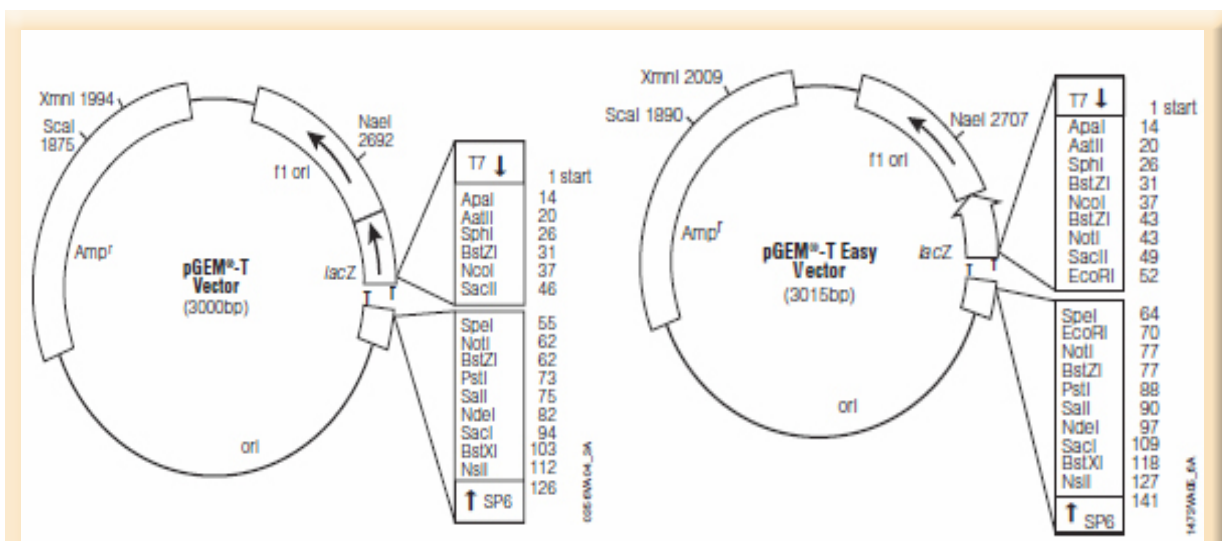


Figura 10.1
Estructura de los plásmidos pGEM-T (3.000 nt) y pGEM-T easy (3.015 nt)

adquieren en forma linearizada y presentan un residuo de timina adicional en sus extremos 3' para mejorar la eficiencia de la ligación de los productos de PCR en el plásmido. Contienen la región codificante para la enzima galactosidasa (*lacZ*) cuya inactivación insercional permite la identificación por color de los clones recombinantes. El tamaño de los plásmidos es de 3.000 y 3.015 pares de nucleótidos para pGEM-T y pGEM-T Easy, respectivamente.

10.2.b. pBlueScript II SK +/-

pBlueScript II (Stratagene) es un plásmido de 2.961 pares de nucleótidos derivado del plásmido pUC19 diseñado originalmente por el Dr. Messing en la Universidad de California (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

La designación SK indica que la orientación del polilinker en el sentido de la transcripción de *lacZ* procede del sitio de restricción *SacI* al sitio de restricción *KpnI* (la designación KS indicaría la orientación contraria).

MCS es el sitio de multiclonaje donde se encuentra el polilinker que contiene las enzimas *KpnI*, *ApaI*, *SboI*, *AccI*, *SalI*, *ClaI*, *Hin*-*dIII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, *Bam*HI, *SpeI*, *XbaI*, *NotI*, *Bst*XI y *SacI*. +/- indica las dos posibles orientaciones de la región intergénica del fago filamentos *f1* (que incluye su origen de replicación), clonada en el plásmido, y que permite recuperar una u otra cadena sencilla del plásmido derivado.

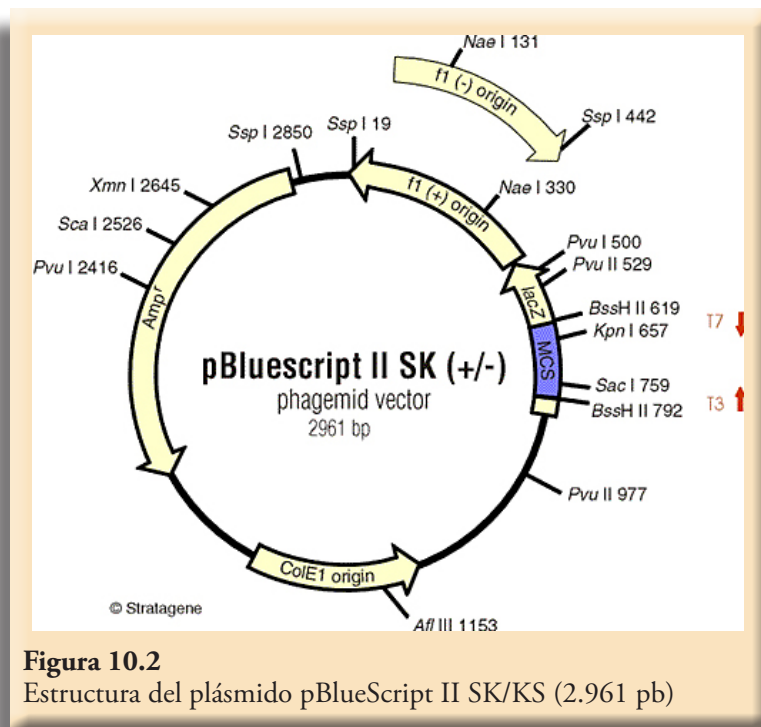


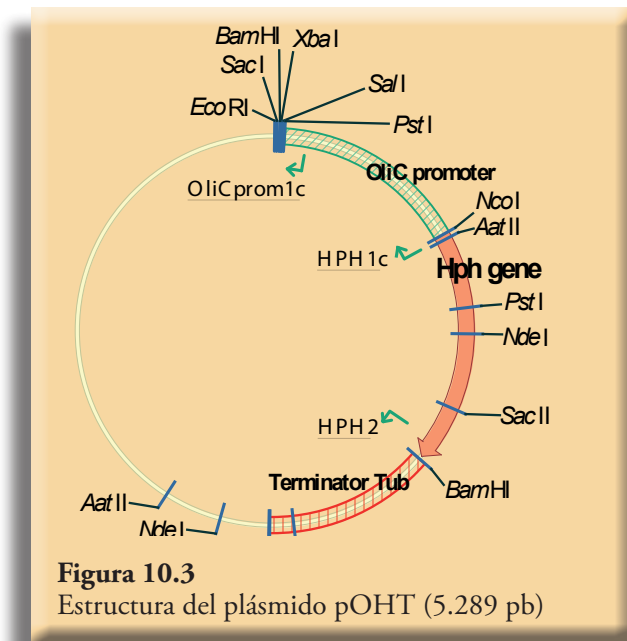
Figura 10.2
Estructura del plásmido pBlueScript II SK/KS (2.961 pb)

10.2.c. pOHT

Plásmido de 5.279 pares de nucleótidos diseñado para proporcionar resistencia a higromicina a *B. cinerea*. Está construido sobre el esqueleto del plásmido pBlueScriptSK+ (Stratagene) en cuyo

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador



polilinker se ha clonado una fusión génica que permite expresar el gen bacteriano de resistencia a la higromicina.

Este casete de resistencia incluye la región estructural del gen que proporciona resistencia a higromicina (1.017 pares de nucleótidos) fusionada al promotor del gen OliC de *Aspergillus nidulans* (876 pares de nucleótidos) y a un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* que incluye la región terminadora del gen de la tubulina (734 pares de nucleótidos).

10.2.d. EMBL3

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

10.3. Tratamientos enzimáticos del ADN

10.3.a. Enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo para la caracterización física de plásmidos y fragmentos de ADN y para la construcción de vectores recombinantes, así como para la clonación de fragmentos de ADN. Las diversas enzimas de restricción fueron proporcionadas por la casa Roche a una concentración de 10 U/ μ l. Se define una unidad (U) como la actividad de la enzima que digiere completamente 1 μ g de ADN en una hora a 37 °C en un volumen total de 50 μ l. El tampón de incubación es proporcionado a una concentración 10 veces superior a la de trabajo por la casa Roche y es específico de cada tipo de enzima.

10.3.b. Defosforilación

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

Después de digerir el plásmido, se elimina la enzima de restricción mediante extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación con etanol. El sedimento de DNA se resuspende en 40 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8 y se reservan 4 µl de DNA para servir de control de la ligación.

La reacción de defosforilación se compone de 5 µl de tampón de fosfatasa alcalina (10×) (Roche Diagnostics, España), 2 µl de fosfatasa alcalina CIP (Roche Diagnostics, España) diluida hasta 0,01 U/pmol de extremos (1 µg DNA 1 Kb = 1,52 pmol DNA = 3,04 pmol de extremos) y agua hasta 50 µl totales de reacción. La mezcla de reacción se incuba durante 30 minutos a 37 °C, se añade una segunda alícuota de 2 µl de enzima y se incuba otros 30 minutos a 37 °C. Para parar la reacción se añade 1 µl de 0,5 M EDTA y se incuba 20 minutos a 65 °C. Se extrae 3 veces con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se precipita con etanol y el precipitado se disuelve en un volumen de agua MilliQ adecuado para las ligaciones posteriores.

10.3.c. Ligaciones

La ligasa DNA T4 cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre terminaciones yuxtapuestas de 5' fosfato y 3' hidroxil en DNA o RNA de doble cadena con extremos romos o cohesivos. Esta enzima requiere ATP como cofactor de la reacción, el cual está presente en un tampón preparado a 10 veces la concentración final de trabajo (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT y 5 mM ATP). La ligasa utilizada fue la comercializada por la casa Fermentas.

Una vez preparadas las reacciones en tubos de 1,5 ml, se incubaron a 22 °C durante al menos dos horas. Como norma general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo en volúmenes de 10 ó 20 µl con las diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1 µl de la suspensión de enzima a una concentración de 1 U/µl.

10.4. Electroforesis

10.4.a. Electroforesis de DNA

Las electroforesis de DNA se llevaron a cabo en geles de agarosa (del 0,6 al 2% dependiendo del fragmento a analizar) preparados en tampón 1 x TAE (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA). Se utilizaron cubetas horizontales utilizándose como tampón de electroforesis el mismo tampón utilizado en la fabricación del gel, es decir, en tampón 1 x TAE. El DNA se mezcló en proporción 6:1 con el tampón de carga de electroforesis (30% glicerol, 0,1% azul de bromofenol y 0,1% xilén cianol FF).

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Se cargaron las muestras en los diferentes pocillos del gel de agarosa incluyendo rutinariamente en cada gel una carrera con una muestra de un marcador de tamaños, normalmente DNA del fago lambda digerido con enzimas diferentes dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles se corrieron a una potencia de unos 6 V/cm aunque ésta se redujo dependiendo del rango de tamaños a resolver y de la cantidad de DNA. Después de 45 a 60 minutos los geles se tiñeron en un baño de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en 1 × TAE durante 20 minutos. El DNA se visualizó por medio de luz ultravioleta y se capturaron las imágenes por medio del sistema de grabación digital de imágenes (UVP, Cambridge, UK).

10.4.b. Electroforesis de RNA

La electroforesis de RNA se realizó en condiciones desnaturizantes siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook *et al.* (1989) y las indicaciones recogidas en el manual de marcaje de sondas DIG (Roche Molecular Biochemicals).

Los geles de RNA proporcionan la matriz y las condiciones desnaturizantes para una correcta separación y detección del RNA. Se preparan con concentraciones variables de agarosa (normalmente 1%) en tampón 1 × MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA pH 7) que contienen 2% formaldehído y 0,5 µg/ml bromuro de etidio.

Las muestras de RNA antes de ser cargadas se mezclaron con 2 volúmenes de tampón de carga. Para 0,5 ml de tampón de carga se añadieron 250 µl 100% formamida desionizada, 83 µl formaldehído, 50 µl 10 × MOPS, 50 µl 100% glicerol, 10 µl 2,5% azul de bromofenol y 57 µl agua 1% DEPC. Tras una incubación de 10 minutos a 65 °C para desnaturizar el RNA, las muestras fueron depositadas en hielo y cargadas en el gel.

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

10.5. Recuperación de fragmentos de DNA

La muestra con el fragmento a recuperar se cargó en un gel de agarosa. La electroforesis se realizó en cada caso en las condiciones que permitían garantizar la máxima separación del fragmento a recuperar del resto de fragmentos de la muestra.

Después de la tinción con bromuro de etidio, se registró la imagen del gel y se procedió a cortar la banda del fragmento a recuperar. En el caso de haber varias muestras para recuperar independientemente en diferentes carreras, éstas se protegieron de la alteración por luz ultravioleta por medio de una película de papel de aluminio.

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

10.6. Transformaciones

10.6.a. Preparación de células competentes de *E. coli*

El método utilizado para la obtención de este tipo de células es el método de RbCl₂ (Hanahan *et al.*, 1991). Para ello se incubaron células de *E. coli* DH5 α en 5 ml LB a 200 rpm y 37 °C toda la noche. Este preinóculo se añadió a 500 ml de medio cuya composición para un litro es 20 g tripton, 5 g extracto de levadura, 0,745 g KCl, 4 g MgSO₄ y ajustado el pH a 7,6 mediante la adición de alícuotas de KOH 10N. El medio se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta una OD550 igual a 0,48 y se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 150 ml de solución TFB1 (12,1 g/l RbCl₂, 6,3 g/l MnCl₂, 2,9 g/l acetato potásico, 1,1 g/l CaCl₂, 15 % glicerol, con pH de 5,8 ajustado con ácido acético y esterilizada por filtración) a 4 °C.

Las células en TFB1 se incubaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 2.500 rpm y 4 °C durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 ml de TBF2 (2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l RbCl₂, 8,3 g/l CaCl₂, 15% glicerol, con pH de 7 ajustado con NaOH y esterilizada por filtración) a 4 °C.

Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo 15 minutos y se repartieron en alícuotas para su conservación a -80 °C.

10.6.b. Transformación de *E. coli*

El método empleado para la transformación de *E. coli* con plásmidos fue la transformación de células competentes mediante choque térmico.

Para cada ensayo de transformación se mezclaron 100 μ l de células competentes con 10 μ l de ADN procedente de reacciones de ligación y la mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Después se sometió a las células a un choque térmico que consistió en una incubación de 2 minutos a 37 °C seguido de otra de 2 minutos en hielo. Se añadieron entonces 500 μ l LB a la mezcla de

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

transformación y ésta se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 45 minutos. Las células se sembraron finalmente sobre placas de medio LB en presencia del agente selectivo y se incubaron 16 horas a 37 °C.

Cuando se pretendía multiplicar un plásmido se recurrió a un procedimiento de transformación más rápido pero menos eficiente. Se mezclaron 10 µl de células competentes con 1 µl de plásmido (100 ng/µl), se incubó la mezcla 1 minuto en hielo, 1 minuto a 37° C y otro minuto en hielo, se añadieron 100 µl de LB a la mezcla de transformación y se sembraron alícuotas de la misma en placas de LB con el medio selectivo.

En el caso de que el plásmido introducido contuviera el gen *lacZ*, sobre las placas donde se siembran las células se extendieron previamente 50 µl de una solución al 2% de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactósido) en N,N dimetilformamida.

El gen *lacZ* codifica el péptido α de la enzima β-galactosidasa que metaboliza el X-Gal produciendo un compuesto derivado de color azul. Cuando se produce una inserción dentro del polilinker introducido entre el operador y el gen estructural de la β-galactosidasa, la enzima codificada no es activa, no se metaboliza el X-Gal y la coloración de la colonia es blanca. Así se seleccionan colonias donde se ha insertado DNA en el polilinker del plásmido.

10.6.c. Transformación de *B. cinerea*

El procedimiento de transformación de *B. cinerea* utilizado es el descrito por Hamada *et al.* (1994) incluyendo las modificaciones indicadas por ten Have *et al.* (1998) y se basa en la utilización de protoplastos y de Poli-Etilen-Glicol (PEG). Para la obtención de protoplastos se partió de esporas de *B. cinerea* inoculadas a una concentración de 5×10^5 esporas/ml en dos matraces de fondo estriado de 500 ml que contenían 100 ml de extracto de malta (ME) al 1%. Los matraces fueron incubados durante 16 horas a 22 °C y 140 rpm. El cultivo se vertió en tubos de 50 ml, se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió agua MilliQ estéril a los tubos y se transfirió el micelio de un tubo a otro dejando sólo dos que se llenaron hasta 50 ml con agua MilliQ estéril. Se centrifugaron los tubos a 1.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió solución KC (0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂, estéril) hasta 50 ml en los dos tubos, se resuspendió el micelio, se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 ml de KC a uno de los tubos, se transfirió el micelio resuspendido al otro tubo, se resuspendió todo el micelio, se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Para la obtención de protoplastos el micelio sedimentado se resuspendió en 50 ml de KC con 0,5 % enzimas de lisis de *Trichoderma harzianum* (L1412, Sigma-Aldrich) disuelto y esterilizado por filtración (Petit *et al.*, 1994). La suspensión de micelio se incubó a 23 °C y 140 rpm en un matraz estéril de 250 ml durante 2 horas, comprobando periódicamente con la ayuda del microscopio el progreso de la formación de protoplastos. Los protoplastos se filtraron a través de una membrana de 25 µm de tamaño de poro. Se añadió solución KC a 4 °C hasta obtener un volumen de 50 ml, se centrifugó la suspensión a 1.500 rpm durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 ml de KC a 4 °C, se centrifugó la muestra a 1.500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado. Finalmente se resuspendieron los protoplastos en el KC restante de la eliminación del sobrenadante y se mantuvieron en hielo.

Para llevar a cabo la transformación de protoplastos se incubaron en primer lugar 10-20 µg de ADN de plásmido o 2-5 µg de producto de PCR disueltos en 95 µl de KC con 5 µl 5mM espermidina en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de la suspensión de protoplastos a la suspensión de ADN y se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos. Después se añadieron y mezclaron suavemente 100 µl de solución PEG compuesta por 25 % PEG 3350, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron otros 500 µl de solución PEG, se mezcló suavemente la mezcla y se prolongó la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron finalmente 200 µl de solución KC y la suspensión se mezcló por inversión.

Para sembrar la suspensión de transformación, ésta fue transferida a un matraz con 100 ml de SH agar líquido (0,6 M sacarosa, 5 mM Tris-HCl pH 6,5, 1 mM NH₄H₂PO₄ y 0,8% agar) a 40 °C que se agita muy suavemente. Se dispusieron alícuotas de 10 ml en placas petri y se dejaron regenerar los protoplastos durante 16-20 horas a 22 °C. Se añadió entonces la cobertera de selección compuesta por SH agar líquido a 48 °C con 70 µg/ml higromicina. Después de dos días de incubación a 22 °C se puede observar el crecimiento de los transformantes resistentes al antibiótico. Estos transformantes son transferidos individualmente a placas de medio MEA suplementado con 70 µg/ml de higromicina.

10.7. Genoteca de ADN genómico

La genoteca de ADN genómico de *B. cinerea* utilizada en este trabajo fue cedida amablemente por el Dr. Jan van Kan de la Universidad de Wageningen (Holanda). Ésta fue construida utilizando el vector bacteriófago EMBL3 de la casa Promega. En primer lugar se digirió parcialmente el DNA genómico de *B. cinerea* con la enzima de restricción *Sau3A*, la cual determina extremos compatibles

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

con *Bam*HI. Se seleccionaron fragmentos de 15.000 a 23.000 pares de bases de tamaño que se ligan con los brazos del bacteriófago EMBL3 con extremos *Bam*HI según el protocolo recomendado por la casa comercial. El DNA fue empaquetado en partículas de bacteriófago utilizando extractos de empaquetamiento incluidos en el kit Packagene de Promega. Con la solución resultante se llevaron a cabo las infecciones correspondientes de *E. coli* LE392 y se cultivaron los fagos hasta obtener halos de lisis no confluentes.

10.8. Amplificación de DNA por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

10.8.a. PCR Estándar

Las amplificaciones de DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo utilizando distintas enzimas polimerasas de DNA dependiendo del objetivo de la amplificación. De este modo, para amplificaciones en las que se precisaba una gran fidelidad se utilizó la enzima AmpliTaq Gold de Applied Biosystems, para comprobaciones rutinarias, por ejemplo, la comprobación de la presencia de fragmentos clonados en plásmidos recombinantes o para identificar transformaciones “positivas”, se utilizó la enzima Biotools DNA polimerasa de B&B labs, y para la amplificación de fragmentos de DNA de gran tamaño se utilizó el TripleMaster PCR System de Eppendorf. Estas DNA polimerasas son enzimas altamente termoestables producidas por organismos termófilos como *Thermus aquaticus* (AmpliTaQ Gold) o *Thermus thermophilus* (Biotools). Las concentraciones de enzima utilizadas en cada caso fueron las recomendadas por la casa comercial, generalmente 1 U por cada 50 µl de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 ó 50 µl que contenían 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada uno de los dos oligonucleótidos cebadores (primers) y 0,05 U de polimerasa por µl de reacción. La cantidad de MgCl₂ varió según la enzima utilizada o el fragmento de DNA a amplificar. Normalmente se utilizó una concentración de 1,6 mM en el caso de la enzima AmpliTaq Gold, 2 mM en el caso de la polimerasa de Biotools y 2,5 mM en el caso de TripleMaster. Cada enzima tiene su tampón específico proporcionado a 10 veces la concentración final de reacción.

La cantidad de molde de DNA usado varió según el tipo de DNA molde y su pureza. La cantidad de DNA usada en el caso de DNA genómico fue entre 50 y 100 ng y para DNA de plásmido o fago fue entre 0,01 y 10 ng. En el caso de que la muestra de ADN contuviera impurezas que pudieran entorpecer la PCR, el DNA se diluyó con agua Milli-Q estéril para tener una mejor reacción. Cuando se quiso comprobar la clonación de un fragmento de DNA en un vector de *E. coli*

se añadió directamente 1 µl de cultivo celular a la mezcla de reacción.

La enzima AmpliTaq Gold se presenta en forma inactiva para prevenir la actividad de la enzima durante la preparación de la reacción, impidiéndose la actividad inespecífica de la enzima. Para su activación se debe calentar durante 10 minutos a 95 °C antes de iniciar los ciclos del programa de PCR.

Los termocicladores utilizados fueron un termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems y un termociclador modelo Mastercycler Gradient de Eppendorf. En los ciclos del programa de PCR la desnaturalización se realizó a 94 °C durante 30 segundos, la hibridación del cebador durante 30 segundos a una temperatura que osciló entre 48 y 59 °C dependiendo del cebador (Tabla 1) y la extensión a 72 °C durante 1 minuto, tiempo al que se le sumó un minuto por cada 1.000 pares de nucleótidos de fragmento amplificado. Normalmente se aplicaron entre 30 y 40 ciclos seguidos de una última fase de extensión de entre 1 y 5 minutos de duración.

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

10.8.b. RT-PCR

Para la obtención de cDNA a partir de ARN total, en primer lugar se eliminaron los posibles restos de DNA genómico que pudieran haber sido copurificados durante la extracción de RNA total, ya que pueden originar amplificaciones no deseadas. Este proceso se realizó utilizando el kit comercial “Turbo DNA-free” de la casa Ambion, Inc. Se trataron 5 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl, con 1 U de Turbo DNase y su correspondiente tampón. La reacción se incubó durante 30 minutos y se procedió a la inactivación de la enzima.

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

En la reacción de transcripción inversa primero se mezclaron 10 µl de ARN libre de ADN (2,5 µg), 1 µl 100 µM Oligo dT16 y 2 µl 2,5 mM de cada dNTP. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C y se dejó en hielo. Seguidamente se añadieron 4 µl de 5 x tampón (Invitrogen) y 2 µl 0,1 M DTT, mezclándose suavemente e incubándose 2 minutos a 42 °C. Se añadió 1 µl (200 unidades) de la enzima SuperScript III RT, se mezcló con un suave pipeteado, se incubó a 42 °C

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

durante 50 minutos y se inactivó la reacción a 70 °C durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

10. 9. Hibridaciones

10.9.a. Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron por un método no radioactivo (DIG, Roche Diagnostics) que se basa en la incorporación de dUTP unido a la digoxigenina a la secuencia de ADN diana. La digoxigenina es un esteroide encontrado en la naturaleza en las plantas de *Digitalis purpurea* y *D. lanata* que debido a sus propiedades bioquímicas tiene facilidad para unirse a anticuerpos. De este modo se puede detectar la digoxigenina y, en su caso, el fragmento marcado correspondiente.

Primero se optimizaron las condiciones de la reacción de marcaje mediante PCR para obtener, en cada caso, una única y clara banda, indicativa de un único y específico fragmento de DNA, del tamaño esperado. Después se realizó el marcaje sustituyendo en la reacción de PCR los dNTPs por Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix de la casa Roche. En paralelo, se llevó a cabo una reacción de PCR con dNTPs normales como control positivo. Se comprobó en un gel de agarosa el correcto marcaje de la sonda ya que la banda correspondiente debe mostrar un tamaño ligeramente superior al del fragmento sin marcar debido al peso añadido de la digoxigenina.

10.9.b. Southern

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

Las muestras de DNA sin digerir o digeridas con distintas enzimas de restricción fueron cargadas en geles de agarosa (0,8%) y sometidas a electroforesis para una correcta separación de los fragmentos digeridos. Los geles se visualizaron con bromuro de etidio y se marcaron convenientemente para identificarlos y orientarlos.

La preparación para la transferencia del DNA del gel a una membrana de nylon consta de cuatro fases consecutivas: depurinación, desnaturalización, neutralización y equilibrado. La depurinación se realiza para favorecer la transferencia de los fragmentos de DNA mayores de 10 kb y consiste en sumergir el gel en un baño de 0,2 N HCl durante unos 20 minutos (hasta que el azul de

Materiales y Métodos

bromofenol se vuelve amarillo). El gel se sumerge posteriormente durante 15 minutos en la solución de desnaturalización (1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH), repitiéndose de nuevo el baño durante otros 15 minutos con una solución de desnaturalización fresca. El gel se lava con agua destilada y se deposita en la solución de neutralización (1,5 M NaCl y 0,5 M Tris-HCl pH 7,5) durante 15 minutos después de los cuales se incuba otros 15 minutos con solución de neutralización fresca. El equilibrado se realiza con $10 \times$ SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato sódico pH 7) durante 10 minutos.

La preparación del blot o conjunto de transferencia se hizo en un tanque que contenía el tampón de transferencia ($20 \times$ SSC) sobre el que disponía una bandeja a modo de puente donde reposaban tres láminas superpuestas de papel Whatman 3MM que se sumergían por sus extremos en el tampón de transferencia. El gel preparado se colocó en posición invertida sobre las láminas de papel Whatman, se eliminaron posibles burbujas usando una pipeta de cristal a modo de rodillo y sobre él se dispuso una lámina de nylon Hybond-N (Amershan, GE Healthcare) de igual tamaño que el gel debidamente marcada para su posterior orientación. Se dispusieron encima del mismo dos piezas de papel Whatman 3MM previamente humedecidas con tampón $10 \times$ SSC y se cubrieron con láminas de papel de plástico las partes no cubiertas por el gel. Sobre la membrana se colocó papel absorbente (10 cm de espesor) y sobre el conjunto se dispuso un peso de 0,5 kg. El gel se dejó transferir por un mínimo de 16 horas después de las cuales se retiró el filtro que se colocó sobre papel Whatman humedecido en $2 \times$ SSC. El gel se fijo mediante irradiación con luz UV en un Stratlinker UV Crosslinker (Stratagen, CA, USA). Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó entre papel secante a 4°C hasta su posterior utilización.

En el caso de que fuera necesario trabajar con colonias de bacterias o con halos de lisis de bacteriófagos, la transferencia del DNA a la membrana se realizó poniendo en contacto directamen-

Primer (cebador)	Secuencia (5'-3')
EP47-A (Frw)	AGGCCACGGATCGGTCA
EP47-B (Rev)	TTCTTCCTCTACCGACC
EP47-C (Frw)	GACGGTACCTTGCAATA
EP47-D (Rev)	GGGGAAAACGGGATGAC
EP47-Y (Frw)	TTCATTGGTGCGCAGCGATC
EP47-Z (Rev)	TCAGTCTTGAAGTGCAGGTG
CYC1 (Frw)	CTACACGCGAGGATCAG
CYC2c (Rev)	ACGGAAGTCGAAGCTAG
CYCprom3 (Frw)	GGTAATGGGCGCCATGTTGG
CYCterm3r (Rev)	CCCTGTACTGCGTCACTTTGG
OLICprom1c (Rev)	CCACTTAGTGGCACGTTCGCG
TRPCterm1 (Frw)	GGGTTTCGCAAAGATAATTGC
OliCprom1c (Rev)	CCACTTAGTGGCACGT CGCG

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Primer (cebador)	Secuencia (5'-3')
hphBc (Rev)	CGTCTGGACCGATGGC TGTG
M13 Reverse Primer (Rev)	CAGGAAACAGCTATGACC
M13 Forward Primer (Frw)	ACTGGCCGTCGTTTAC
OF1 (Oligo Fusión 1)	GGATGCTGTCGACTTCCTTCTCATCCTTCTT
OF2 (Oligo Fusión 2)	GATGAGTCTAGATAAATTAGCATCCGAGTT
P22 (Frw)	GATAGCATTG
RT1 (Rev)	TTTTTTTTTTTGG
0496-A (Frw)	TGGTTGTCATGCGATGTTGG
0496-B (Rev)	CAATTCAACCCAGCTTCCC
1038-A (Frw)	GGGTTGACATTACTTCTGGC
1038-B (Rev)	GCAAGTAGTATCGTATCTCCG
2080-A (Frw)	TGAAGCATTCGAAGCTCGCG
2080-B (Rev)	TCTGTCTCCTCATCGGCATC
2266-A (Frw)	AGTTCTCACACAAGGAACGG
2266-B (Rev)	TTTGGTCCCTCGGTACATCG
2325-A (Frw)	GCTGTTGCTGTGGAAGTTGG
2325-B (Rev)	ATTTTCCAAGCGACGCCGAG
5375-A (Frw)	CGTCGTTACGCCGCTTCTAC
5375-B (Rev)	TGCGAAGCTGATGGGAATCC
5733-A (Frw)	GGATAGATAACTCCTCCGTC
5733-B (Rev)	CCACATCCACAACCACATGC
5733-C (Frw)	GTGCTGGTGCTGTTATTAGG
5733-D (Rev)	CCATACACAGTATCCAAATCC
9097-A (Frw)	CACCGGCTCTTGGCATACTG
9097-B (Rev)	TCCAATTCCTTGCCACCATC
9100-A (Frw)	TAGATTAAGCAGCCGATGGC
9100-B (Rev)	CGATCTCTATCAAAGCGAGC
Bot_116-A (Frw)	TAGTGA AAAATTCGCGGGACG
Bot_116-B (Rev)	GTCAGATTCAGATGGACCGC
Bot_116-C (Frw)	AGGGTAGGGGGTATGGGATG
Bot_116-D (Rev)	GTACGATTCATAACGCGAGC
Bot_167-A (Frw)	CGAATGACAACCCATCTTGG
Bot_167-B (Rev)	CGAGGTAAAGCGCTGTACAG
Bot_167-C (Frw)	AGGGTAGGGGGTATGGGATG
Bot_167-D (Rev)	GTACGATTCATAACGCGAGC
Bot_37-A (Frw)	TCTGGGAAGAAGCTTAGTCC
Bot_37-B (Rev)	CTCCTCAGCAGATTCTTCGG

Tabla 10.I
Oligonucleotidos utilizados en este trabajo

te la membrana de nylon sobre la placa de medio de cultivo durante 20 segundos. Las membranas se transfirieron después a láminas de papel Whatman 3MM humedecido primero en solución de desnaturalización durante 5 minutos, después en solución de neutralización y por último en $2 \times$ SSC. Se lavaron finalmente con $2 \times$ SSC, se colocaron sobre un papel secante y se fijó el DNA con el Stratalinker. La transferencia de la membrana por las distintas láminas de papel Whatman 3MM siempre se hizo por la cara de la membrana que no había entrado en contacto con los fagos.

La hibridación de la membrana de nylon con la sonda se realizó en bolsas selladas de plástico. En primer lugar se realiza la prehibridación, que consistió en incubar la membrana con el tampón de hibridación ($5 \times$ SSC, 0,1% N-laurilsarcosina, 0,02% SDS y 1% Blocking reagent) durante una hora a 65 °C. Se desnaturalizó la sonda a 95 °C durante 10 minutos y se añadió a la bolsa de prehibridación. El conjunto se hibridó durante 16 horas a 65 °C para hibridaciones con sondas absolutamente homólogas. Después se dismanteló el conjunto para proceder a la detección de la sonda, guardándose el tampón de hibridación que contiene la sonda para futuros usos.

La membrana se lavó dos veces en $2 \times$ SSC / 0,1% SDS durante 5 minutos por cada lavado y a temperatura ambiente. Después se lavó otras dos veces en $0,5 \times$ SSC / 0,1% SDS durante 15 minutos a 65 °C si se había realizado una hibridación con sonda homóloga. Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente con tampón de lavado consistente en 100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, 0,3% tween 20, pH 7,5. La membrana se transfirió a una solución de "1 \times Blocking solution" disuelto en 100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, pH 7,5, durante al menos 30 minutos.

Posteriormente la membrana se incubó en 1 \times Blocking solution (Roche Diagnostics) con 0,75 U/ μ l de antidigoxigenina (Roche) durante media hora a temperatura ambiente. Luego se lavó dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente en tampón de lavado y se incubó durante 3 minutos en tampón de detección (10 mM Tris, 10 mM NaCl pH 9,5). La membrana se colocó sobre una lámina de papel de plástico y sobre ella se extendió 1 ml del sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) diluido 1:100 en tampón de detección por cada 100 cm² de membrana. La membrana se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, transcurridos los cuales fue transferida a una nueva lámina de plástico y se procedió a detectar la quimioluminiscencia. Para ello se utilizaron películas autorradiográficas Kodak X-OMATAR o se utilizó el equipo de detección de quimioluminiscencia Intelligent Dark Box II (LAS 3000) de Fujifilm.

Para la eliminación de la sonda de la membrana, ésta fue lavada con agua destilada y posteriormente se realizaron dos lavados con $0,1 \times$ SSC / 0,1% SDS hirviendo. Para la posterior conservación de la membrana, ésta se lavó con $2 \times$ SSC y se dejó secar a temperatura ambiente sobre una pieza de papel Whatman 3MM.

10.9.c. Northern

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

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

La prehibridación y la hibridación se realizaron con el tampón de hibridación de alta concentración de SDS (high SDS buffer) que se compone de 7% SDS, 50% formamida desionizada, 5 × SSC, 50 mM fosfato sódico pH 7 y 0,1% N-laurilsarcosina.

La prehibridación se realizó a 50 °C durante una hora. La sonda se desnaturalizó a 95 °C durante 10 minutos y se añadió a la membrana prehibridada con el tampón de hibridación de alto SDS. La hibridación se llevó a cabo durante más de 16 horas y una vez finalizada se conservó el tampón con la sonda a -20 °C para futuros usos.

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

10.10. Secuenciación

El servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca fue el responsable de la secuenciación de DNA (<http://www.usal.es/~secuenciacionADN/>). El servicio consta de un secuenciador ABI PRISM 377 de la casa Applied Biosystems. Para la obtención de la secuencia se proporcionaron 500 ng de ADN de plásmido y 3 pmol de cebador en un volumen de 8 µl. La información generada fue proporcionada en forma de cromatogramas que fueron visualizados y editados con el programa informático Chromas (Technelysium Pty Ltd).

11. Análisis y presentación de datos

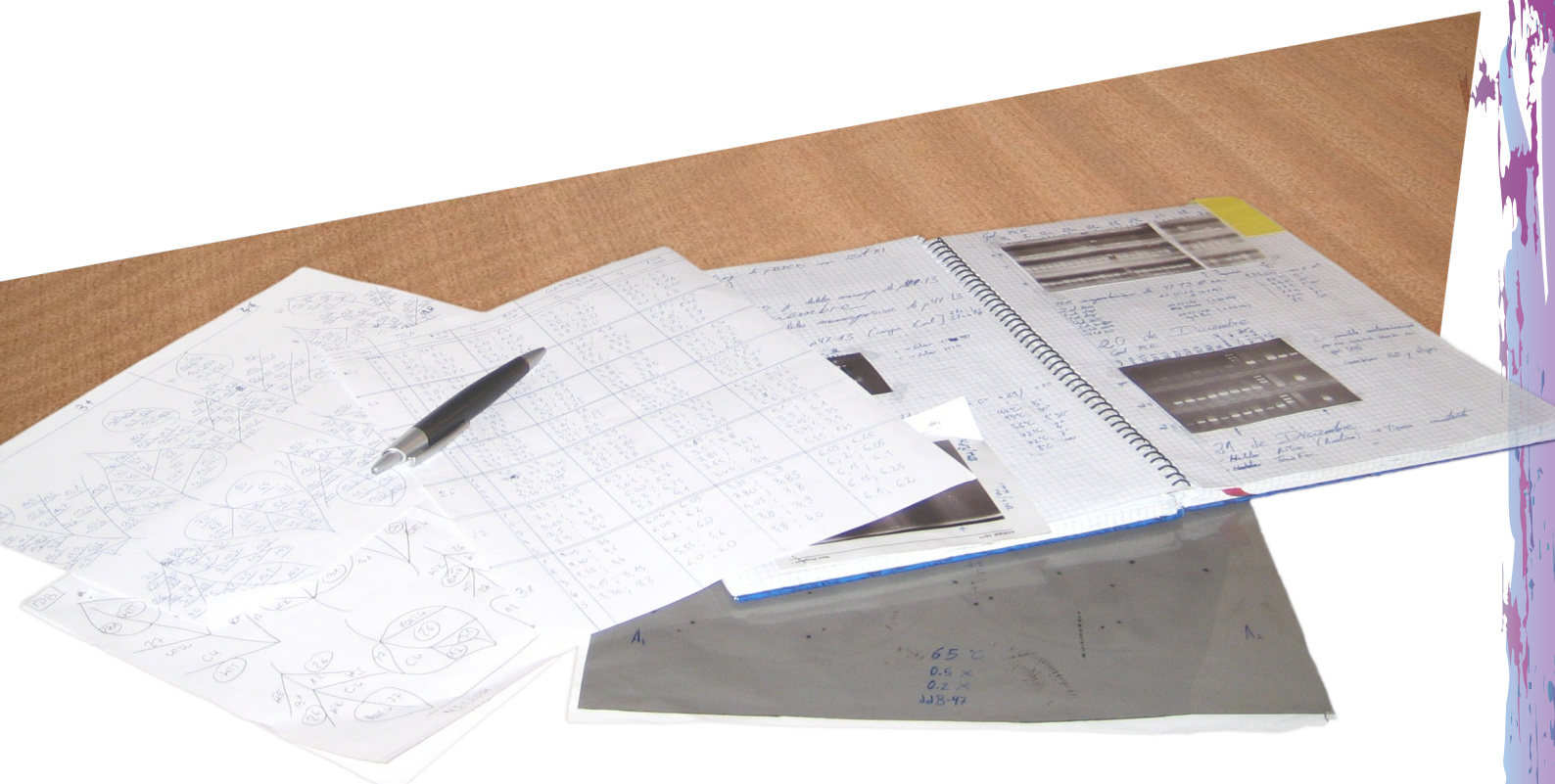
El procesamiento de secuencias, alineamiento, edición de plásmidos y diseño de cebadores se realizó gracias al programa Vector NTI suite 10 (Invitrogen). Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) y el programa Genious 4.7.6 (www.genious.com).

Las bases de datos de nucleótidos, proteínas y genomas se utilizaron a través de páginas Web. El servidor Expasy (<http://www.expasy.ch/>) proporcionó los programas y accesos a páginas web para la determinación de dominios, localización subcelular, alineamiento y estructura de proteínas. La base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se utilizó para consulta de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como la predicción de estructuras 3D de proteínas. El análisis de los dominios conservados de proteínas se realizó mediante el programa CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). La consulta del genoma de *B. cinerea* se realizó mediante consulta de la base de datos del Broad Institute (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/botrytis_cinerea/index.html) y de Genoscope (http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_LN/organisme_LN.html).

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

El análisis estadístico de datos se realizó mediante el programa SPSS v.17. En todos los trabajos de ofimática se usaron los programas del entorno Office de Windows. El manejo de bibliografía se agilizó con EndNote X2. El diseño gráfico, la edición de imágenes y la maquetación se realizaron con los programas Adobe Photoshop CS3, Adobe Illustrator CS3 y Adobe InDesign CS3.

Resultados



12. El gen Bde47

12.1. Hibridaciones

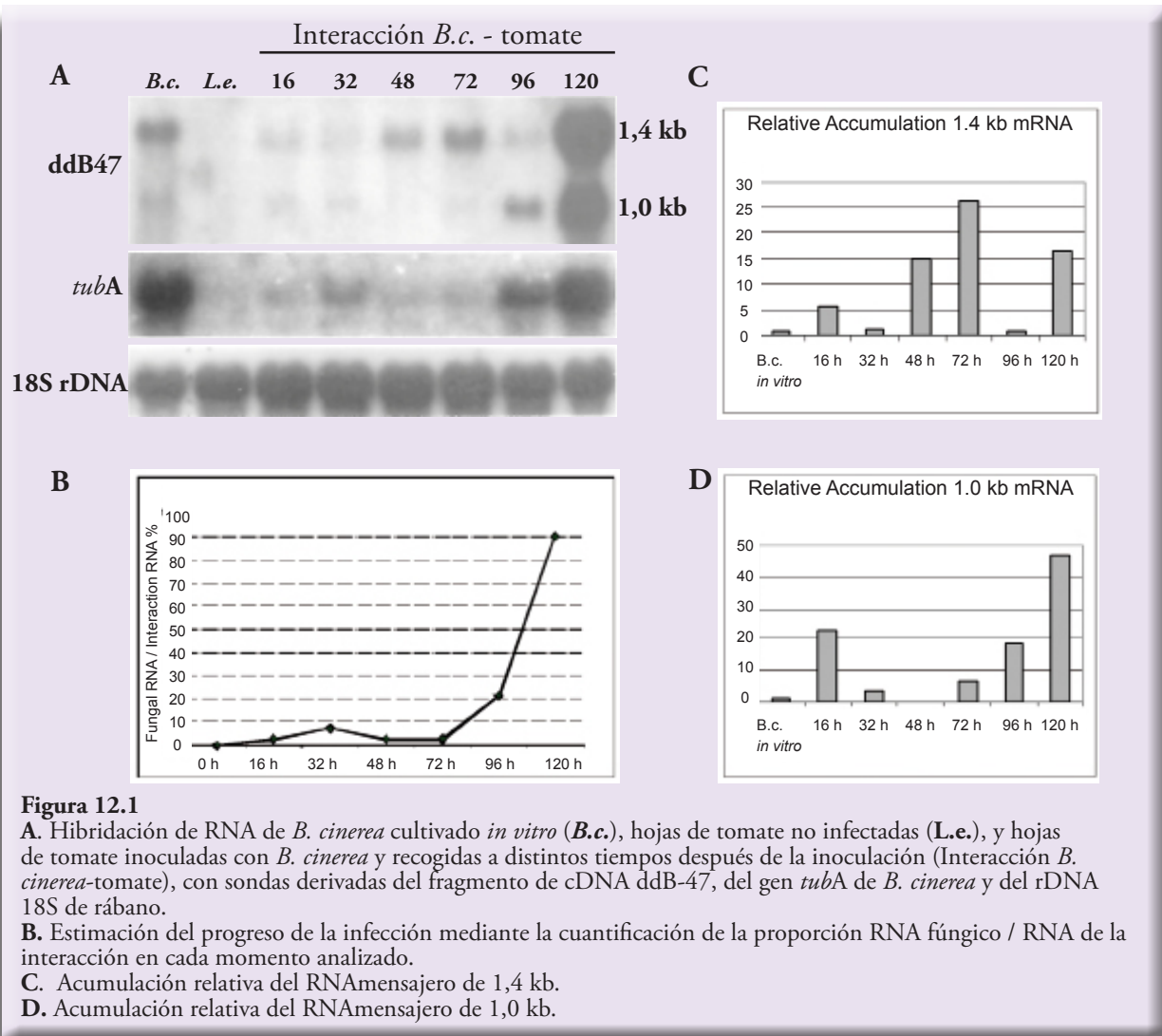
Con objeto de caracterizar el gen Bde47 de *B. cinerea*, cuya expresión resulta inducida durante fases específicas del proceso de infección del patógeno sobre un huésped modelo, el tomate, se tomó como punto de partida la información derivada de experimentos de hibridación de tipo Northern. Estos experimentos fueron llevados a cabo utilizando como sonda el fragmento de cDNA de *B. cinerea* denominado “ddB47” sobre muestras de RNA obtenidas a partir de micelio del patógeno cultivado *in vitro* y sobre muestras de RNA obtenidas a partir de tejido vegetal infectado y recogido a distintos tiempos después de la inoculación (Benito *et al.*, 1996). Como se indicó en la sección 5.3.b.2. de la Introducción, el fragmento “ddB47” es un fragmento de cDNA de *B. cinerea* detectado mediante “DDRT-PCR” en el curso del análisis comparativo del patrón de expresión del patógeno durante el crecimiento saprofito con su patrón de expresión durante la interacción con la planta huésped seleccionada (Benito *et al.*, 1996). En los experimentos de caracterización inicial pudo comprobarse que dicho fragmento de cDNA permite detectar mediante hibridación dos RNA mensajeros de tamaños diferentes, mensajeros que muestran patrones de acumulación en las distintas fases del proceso de infección analizadas también diferentes.

12.2. Análisis de la expresión génica

Para llevar a cabo el análisis y la cuantificación detallada de los patrones de expresión de los RNA mensajeros que codifican los supuestos genes de los que se derivó el fragmento “ddB47” se preparó una membrana de nylon a la que se transfirieron, en cada caso, 20 µg de RNA total extraído a partir de micelio cultivado *in vitro*, de hojas de tomate sanas o de hojas de tomate infectadas con *B. cinerea* y recogidas a distintos tiempos después de la inoculación (Ver sección 9.2.b. de Materiales y Métodos). La Figura 12.1A muestra los resultados obtenidos en las hibridaciones llevadas a cabo con sondas derivadas del fragmento de cDNA “ddB47” de *B. cinerea* (Benito *et al.*, 1996), del gen *tubA* de *B. cinerea* (Benito *et al.*, 1998) y del gen codificador del rRNA 18S de rábano (Grellet *et al.*, 1989). Como se ha demostrado previamente (Benito *et al.*, 1998) esta última sonda hibrida de manera muy similar tanto con el rRNA 18S de tomate como con el rRNA 18S de *B. cinerea*. Por

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador



lo tanto, la intensidad de la señal de hibridación obtenida con esta sonda en muestras derivadas de material infectado, muestras “interacción”, refleja la suma total del RNA de la planta y del hongo cargado en cada carrera del gel de electroforesis. En consecuencia, las diferencias que pudieran detectarse en la intensidad de esta banda de hibridación entre las diferentes carreras permiten corregir diferencias de la cantidad de RNA total cargado en cada caso.

El análisis de la señal obtenida en la hibridación con la sonda derivada del gen *tubA*, gen de expresión constitutiva, permite estimar la proporción de RNA del hongo en la mezcla de RNA del hongo y de RNA de la planta (RNA interacción) que constituye cada muestra de RNA total extraído a partir de material infectado y, por lo tanto, permite estimar la proporción de biomasa del hongo en el material infectado. Este dato es esencial para poder comparar los niveles de expresión de genes del patógeno en cualquier fase del proceso de infección en relación con sus niveles de expresión durante el crecimiento saprofito *in vitro*. Con este objeto, las señales obtenidas en la hibridación con la

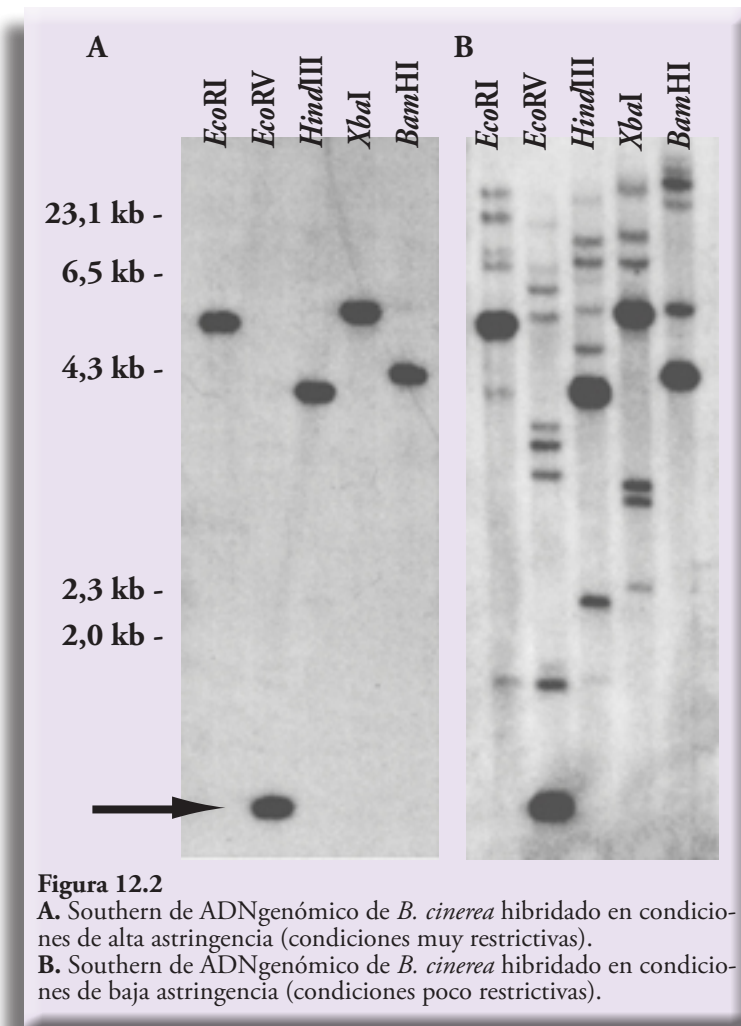
sonda *tubA* fueron analizadas densitométricamente. El gráfico de la figura 12.1B presenta la relación entre la intensidad de la señal obtenida con esta sonda en cada muestra de material analizado y la intensidad de la señal obtenida con la misma sonda en la muestra de RNA extraído a partir de micelio cultivado *in vitro*, una vez corregidas las diferencias de carga estimadas teniendo en cuenta la intensidad de la banda de hibridación obtenida con la sonda derivada del gen codificador del rRNA 18S de rábano. La fórmula aplicada en cada caso es: $I_{tubA} \text{ (Interacción)} / I_{tubA} \text{ (} B. cinerea \text{ in vitro)} \times I_{rDNA} \text{ (} B. cinerea \text{ in vitro)} / I_{rDNA} \text{ (Interacción)}$. Se comprueba que esta relación es pequeña, aproximadamente un 3 %, y se mantiene constante durante las primeras fases del proceso de infección, hasta las 72 hpi. Se observa entonces un rápido incremento, alcanzando un 21% a las 96 hpi y un 90% a las 120 hpi. Estas estimaciones en este experimento de inoculación concreto se ajustan con precisión a las estimaciones realizadas en experimentos de inoculación previos en condiciones de laboratorio, observación que confirma la validez y reproducibilidad del procedimiento de inoculación artificial establecido (Benito *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta estos datos es posible estimar los niveles de expresión *in planta* de cualquier gen del patógeno en relación con su nivel de expresión durante su cultivo *in vitro*. La hibridación realizada con el fragmento “ddB47” permite detectar dos RNA mensajeros de tamaño diferente: el primero con un tamaño estimado de aproximadamente 1,4 kb y el segundo con un tamaño estimado aproximado de 1,0 kb (Figura R13.1A). Las señales de hibridación obtenidas fueron cuantificadas densitométricamente y normalizadas en relación con la proporción de RNA del patógeno presente en la muestra de RNA total de la interacción en cada muestra analizada. Los datos obtenidos se presentan en las Figuras 12.1C y 12.1D. Ambos mensajeros se detectan en las muestras derivadas de micelio cultivado *in vitro*, indicando que el gen o genes codificadores de estos mensajeros se expresan durante el crecimiento saprofito. *In planta* los dos RNA mensajeros muestran patrones de acumulación diferentes, con máximos y mínimos de acumulación característicos de cada uno de ellos. Su estudio demuestra que la expresión del gen o genes codificadores de estos dos mRNAs se induce en fases concretas del proceso de infección, mostrando cada uno de ellos un patrón de expresión transitoria característico. Así, el gen que codifica el RNA mensajero de 1,4 kb muestra máximos de expresión durante las fases de penetración (16 hpi), de formación de lesiones dispersivas (72 hpi) y de colonización del tejido infectado (120 hpi). A las 32 hpi y a las 96 hpi sus niveles de expresión son muy bajos, comparables a su nivel de expresión durante el cultivo en medio líquido (Figura 12.1C). Por su parte, en el caso del RNA mensajero de 1,0 kb los niveles de expresión del gen correspondiente son máximos a las 16 hpi y a las 120 hpi, decayendo hasta niveles indetectables a las 48 hpi (Fig. 12.1D).

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Para determinar la organización del gen o genes codificadores de los dos RNA mensajeros detectados, se llevó a cabo un análisis de tipo Southern utilizando un filtro de nylon al que habían sido transferidos los fragmentos de DNA resultantes de la digestión de DNA genómico de *B. cinerea* con diferentes enzimas de restricción. Como sonda se utilizó el fragmento de cDNA “ddB47”. La Figura 12.2 muestra los resultados obtenidos. Cuando se aplicaron condiciones de hibridación muy restrictivas (Fig. 12.2A) se detectó una única banda de hibridación y, por lo tanto, un único fragmento de DNA, en cada una de las carreras correspondientes a cada una de las digestiones consideradas. Estas observaciones indican, en principio, que la sonda “ddB47” detecta una secuencia (gen) de copia única en el genoma de *B. cinerea*. Sin embargo, cuando se aplican condiciones de hibridación



menos restrictivas (Fig. 12.2B), en cada una de las carreras del filtro preparado se detectan, además, varias bandas adicionales, aunque de menor intensidad que aquella detectada en condiciones de alta astringencia. Tomadas en su conjunto, estas observaciones sugieren que el fragmento de cDNA “ddB47” deriva de un mensajero codificado por un gen presente en el genoma de *B. cinerea* en copia única. Este mensajero sería uno de los dos mensajeros detectados en el análisis Northern. Existen, no obstante, secuencias relacionadas en el genoma de *B. cinerea* con un elevado grado de homología con la sonda utilizada, alguna de las cuales constituye un segundo gen que codifica el segundo de los RNA mensajeros detectados en el Northern.

12.3. Aislamiento del gen Bde47A

Se inició entonces el aislamiento y la caracterización del gen o genes que codifican estos dos RNA mensajeros. Decidimos clonar en primer lugar la secuencia de DNA genómico de *B. cinerea* de copia única detectada mediante hibridación en condiciones de alta astringencia. Utilizando estas condiciones de hibridación se escrutó una genoteca de DNA genómico de *B. cinerea* (cepa SAS56) construida en el vector lambda EMBL3 (van derVlugt-Bergmans *et al.*, 1997). En un filtro de nylon al que se habían transferido aproximadamente 5.000 fagos recombinantes, se detectaron

dos clones positivos que fueron purificados utilizando los procedimientos habituales (Figura 12.3). Cuando el mismo filtro se hibridó con la sonda “ddB47” pero en condiciones de baja astringencia se detectaron varios fagos adicionales que mostraban señales de hibridación menos intensas (Figura 12.4). En un principio los halos de lisis numerados con los códigos B1 a B15 fueron picados de la placa original y conservados a 4 °C (hasta su posterior caracterización). Asumimos que entre estos fagos será posible identificar el gen que codifica el segundo de los mensajeros detectados en el análisis northern llevado a cabo.

Se preparó DNA de los dos fagos detectados en condiciones de alta astringencia, denominados fB47-1 y fB47-2. Mediante análisis de restricción y de hibridación se comprobó que ambos fagos eran idénticos y que incluían, por lo tanto, el mismo inserto. La Figura 12.5 muestra el mapa de restricción de la región de DNA genómico de *B. cinerea* incluida en estos dos fagos y que hibrida con la sonda “ddB47” y

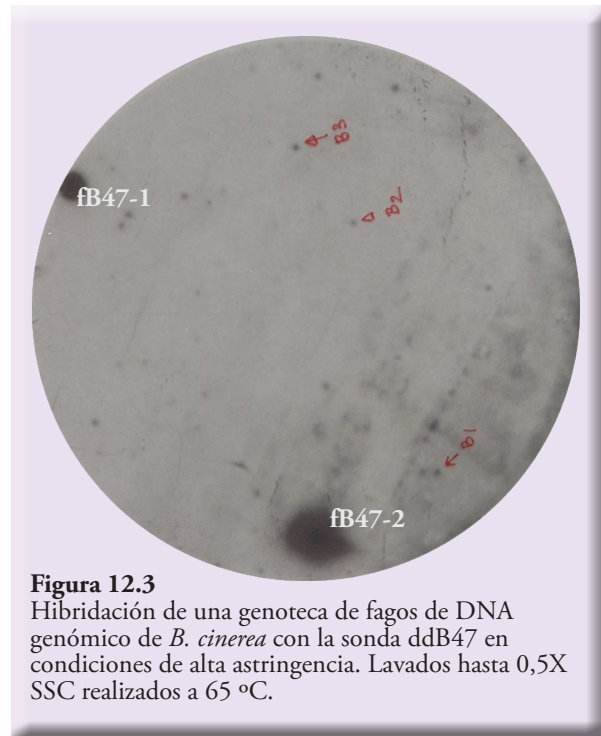


Figura 12.3
Hibridación de una genoteca de fagos de DNA genómico de *B. cinerea* con la sonda ddB47 en condiciones de alta astringencia. Lavados hasta 0,5X SSC realizados a 65 °C.

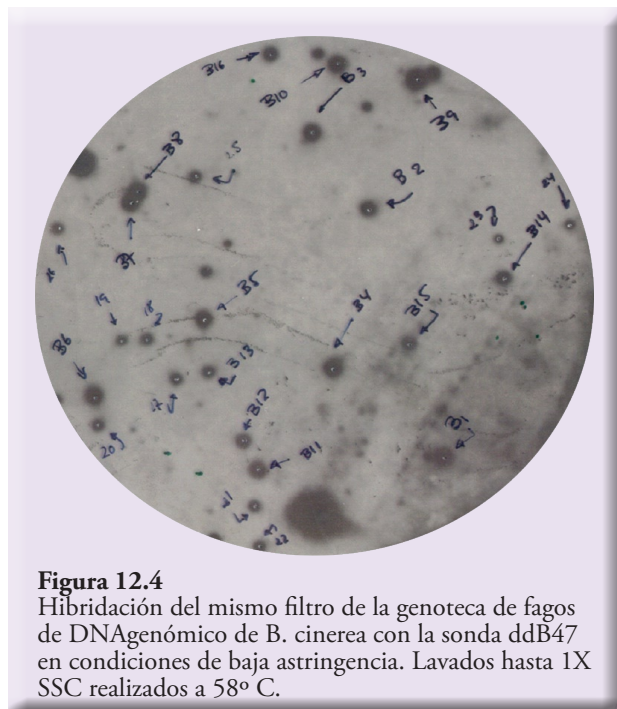


Figura 12.4
Hibridación del mismo filtro de la genoteca de fagos de DNA genómico de *B. cinerea* con la sonda ddB47 en condiciones de baja astringencia. Lavados hasta 1X SSC realizados a 58° C.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

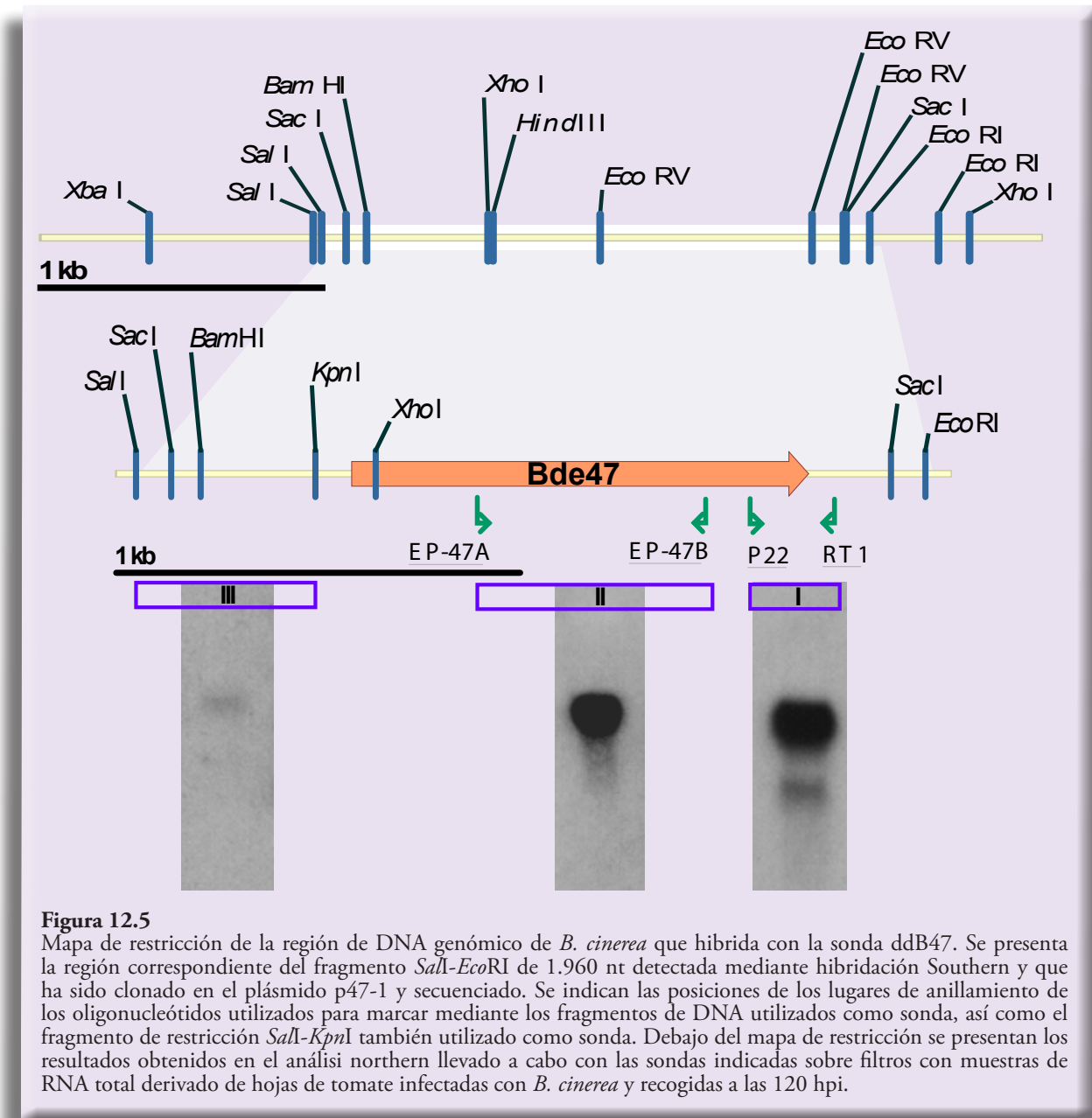


Figura 12.5

Mapa de restricción de la región de DNA genómico de *B. cinerea* que hibrida con la sonda ddB47. Se presenta la región correspondiente del fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nt detectada mediante hibridación Southern y que ha sido clonado en el plásmido p47-1 y secuenciado. Se indican las posiciones de los lugares de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados para marcar mediante los fragmentos de DNA utilizados como sonda, así como el fragmento de restricción *SalI-KpnI* también utilizado como sonda. Debajo del mapa de restricción se presentan los resultados obtenidos en el análisis northern llevado a cabo con las sondas indicadas sobre filtros con muestras de RNA total derivado de hojas de tomate infectadas con *B. cinerea* y recogidas a las 120 hpi.

sus regiones flanqueantes. En la misma figura se muestra la ubicación del fragmento de restricción *EcoRV-EcoRV* de 750 pb de tamaño detectado en el Southern de DNA genómico. El fragmento *SalI-EcoRI* de aproximadamente 2,0 kb que incluye este fragmento *EcoRV-EcoRV* fue clonado en el plásmido BlueScript SK, dando lugar al plásmido p47-1, y su secuencia fue determinada (las dos cadenas fueron secuenciadas completamente). Este fragmento resultó tener un tamaño de 1.960 nt. La secuencia completa del mismo se presenta en la Figura 12.6. El análisis de la secuencia nucleotídica determinada permitió identificar la secuencia del fragmento de “differential display” “ddB47” aislado inicialmente (Benito *et al.*, 1996) y que ha sido utilizado como sonda de hibridación. La Figura 12.6 muestra el alineamiento de la secuencia del fragmento *SalI-EcoRI* de ADN genómico de 1.960 nt y

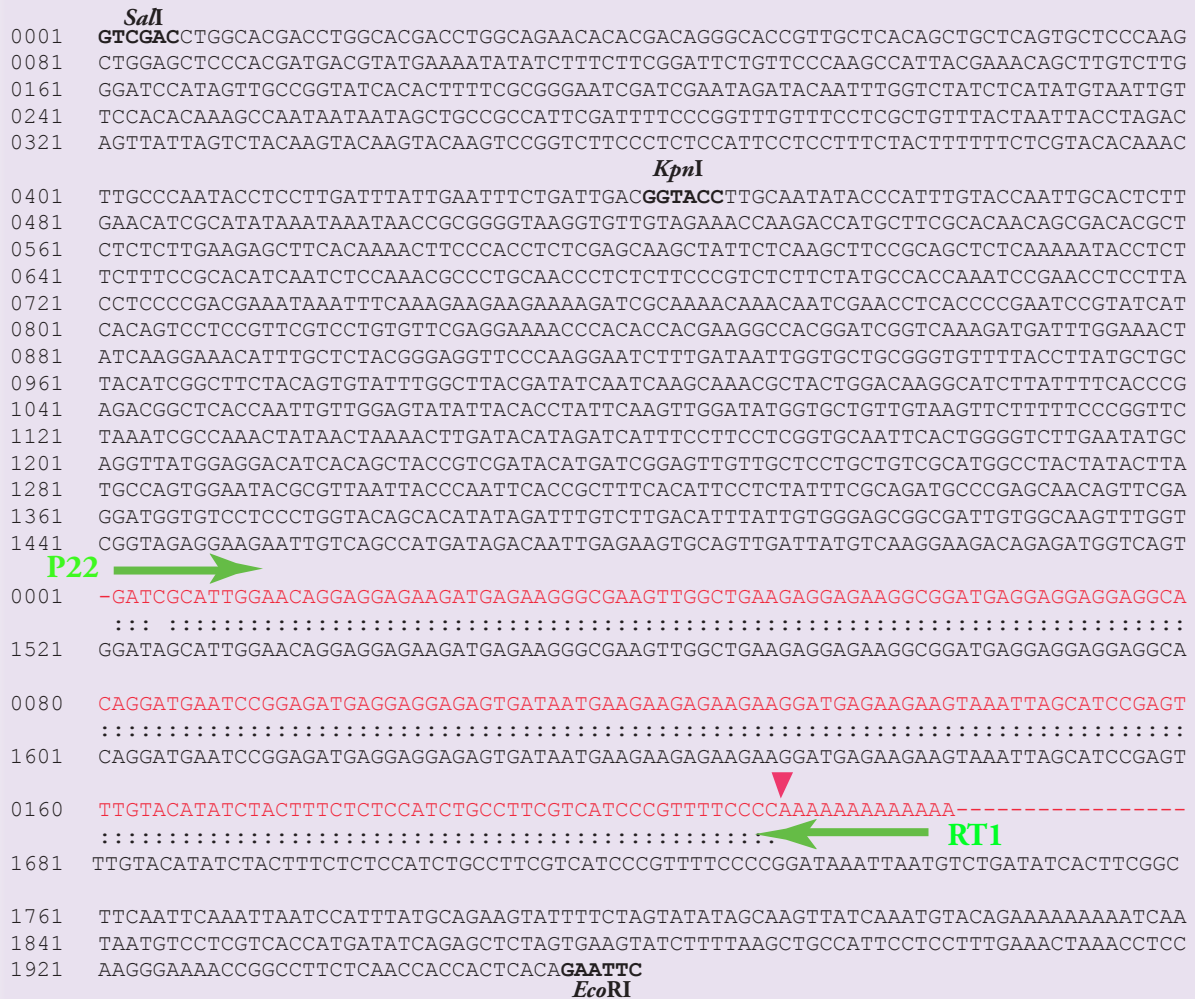


Figura 12.6
 Alineamiento de las secuencias de nucleotidos del fragmento SalI-EcoRI de 1.960 nucleotidos clonado en p47-1 y del fragmento de cDNA ddB47. Se indican las posiciones y orientaciones de los cebadores P22 y RT1 utilizados para la amplificación del fragmento ddB47. Se indica también la posición del sitio de poliadenilación (▼).

la secuencia del fragmento “ddB47”. La localización y orientación de los cebadores utilizados en el análisis de expresión génica diferencial llevado a cabo mediante “differential display” que permitió el aislamiento de dicho fragmento “ddB47” (secuencias descritas en Benito *et al.*, 1996) se muestran en la Figura 12.5 y 12.6. Las secuencias originales de estos cebadores son las siguientes:

- Decámero Directo **P22** (5’-GATAGCATTG-3’), cuya secuencia se encuentra localizada próxima al extremo *EcoRI* del fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nt en la cadena de DNA que discurre en dirección 5’-3’ desde el sitio de restricción *SalI* y hacia el sitio de restricción *EcoRI*
- Cebador Reverso **RT1** (5’-TTTTTTTTTTTGG-3’), cuya secuencia representaría el extremo de la región 3’ transcrita del gen codificador correspondiente, marcando la por-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

ción del sitio de poliadenilación y que en el fragmento *SalI* - *EcoRI* de 1.960 nt donado en el plásmido p47-1 se encuentra próxima al extremo *EcoRI* y en la cadena que discurre en dirección 5'-3' desde el sitio de restricción *EcoRI* y hacia el sitio de restricción *SalI*.

La copia genómica de la región correspondiente al decámero P22 muestra una variación respecto a la secuencia del propio cebador P22 y, por lo tanto, a la secuencia del fragmento de cDNA “ddb47” (Benito *et al.*, 1996), en la posición “4” de dicho cebador, cambio que podemos explicar si tenemos en cuenta la baja temperatura de anillamiento utilizada en el perfil de PCR que se aplicó en el análisis de “differential display” que permitió detectar este fragmento de cDNA. De acuerdo con el principio del método “differential display”, este fragmento de cDNA debe representar el extremo 3' de un RNA mensajero y la fase abierta de lectura del gen que codifica dicho RNA mensajero debe discurrir de izquierda a derecha en el esquema presentado en la Figura 12.5, desde el sitio *SalI* y hacia el sitio *EcoRI*.

La secuencia del fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nucleótidos fue comparada con las secuencias de nucleótidos depositadas en las bases de datos públicas. Inicialmente no se detectó ninguna homología significativa con secuencias de nucleótidos previamente caracterizadas. Se realizó entonces un análisis de las secuencias de aminoácidos resultantes de la traducción de las seis posibles fases de lectura que podemos considerar en la secuencia de nucleótidos de dicho fragmento. Sólo en una de las fases de lectura se detectó una posible fase de lectura abierta que pudiera dar lugar a un RNA mensajero del tamaño detectado en el análisis northern. Dicha fase abierta de lectura discurría efectivamente de izquierda a derecha en el esquema de la Figura 12.5, desde el sitio *SalI* y hacia el sitio *EcoRI*, y resultaba de la eliminación de un intrón de 56 nucleótidos.

Para confirmar que esta fase de lectura es la fase de lectura cuya transcripción origina al menos uno de los RNA mensajeros detectados por hibridación, y para determinar con mayor precisión su localización, se llevó a cabo un análisis de hibridación tipo Northern utilizando como sondas distintos fragmentos de DNA derivados del fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nucleótidos clonado en el plásmido p47-1. Para facilitar el análisis en estas hibridaciones se utilizaron membranas de nylon a las que se habían transferido, en cada caso, 20 µg de RNA total extraído a partir de hojas de tomate infectadas inoculadas con *B. cinerea* y recogidas a las 120 hpi, momento en el que la acumulación de los RNA mensajeros analizados es mayor. Los resultados se muestran en la parte inferior de la Figura 12.5. Cuando se utiliza como sonda el fragmento I, que es el fragmento de cDNA “ddb47” amplificado y marcado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos P22 y RT1, se reproduce el patrón de hibridación obtenido originalmente con esta sonda (ver Figura 12.1), detectándose dos

bandas de diferente intensidad correspondientes a dos RNA mensajeros de aproximadamente 1,4 y 1,0 kb, respectivamente.

Posteriormente se utilizó como sonda el fragmento II, un fragmento de DNA amplificado y marcado mediante PCR utilizando una nueva pareja de oligonucleótidos:

- **EP-47A (5'-AGGCCACGGATCGGTCA-3')** cuya secuencia coincide con la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del gen Bde47 entre las posiciones +312 y +328.
- **EP-47B (5'-TTCTTCCTCTACCGACC-3')** cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de la secuencia de la cadena codificante del gen Bde47 entre las posiciones +919 y +903 (ver Figura 12.5), y derivado de la región inmediatamente adyacente al fragmento I en dirección al sitio de restricción *SalI*.

Cuando se utiliza este fragmento II como sonda sólo se detecta el RNA mensajero de mayor tamaño de los dos RNA mensajeros buscados. Por lo tanto, esta sonda es específica del RNA mensajero de 1,4 kb.

Finalmente, cuando se utiliza como sonda el fragmento de restricción *SalI-KpnI* de 450 pares de bases correspondiente al extremo distal del fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nucleótidos secuenciado (fragmento III), también se detecta únicamente el RNA mensajero de mayor tamaño, aunque la intensidad de la banda observada es muy reducida en comparación con las bandas correspondientes a este mensajero detectadas con las otras dos sondas. Esta observación indica que el origen de transcripción del gen codificador del RNA mensajero de 1,4 kb está localizado muy próximo al sitio de restricción *KpnI*.

En resumen, teniendo en cuenta los datos de los análisis de tipo Northern y de tipo Southern realizados se concluye que los dos RNA mensajeros detectados con el fragmento “ddB47” están codificados por dos genes diferentes que manifiestan un cierto grado de homología en parte de su secuencia, que en el caso del gen que codifica el RNA mensajero de 1,4 kb se limita a la región 3' del mismo. Además, el clon aislado de la genoteca utilizando condiciones restrictivas de hibridación incluye el gen que se transcribe originando el RNA mensajero de 1,4 kb. Decidimos entonces denominar inicialmente “Bde47A” (*Botrytis differentially expressed 47A*) al gen codificador del RNA mensajero de 1,4 kb y “Bde47B” al gen codificador del RNA mensajero de 1,0 kb. El presente capítulo se centrará en el análisis y caracterización del gen Bde47A. En capítulos siguientes se describirán las aproximaciones experimentales y los intentos llevados a cabo para tratar de clonar el gen Bde47B.

12.4. Análisis de la secuencia del gen Bde47A

A continuación se presenta la secuencia de nucleótidos del fragmento *SaII-EcoRI* de 1.960 nucleótidos que se muestra en la Figura 12.5 y clonado en el plásmido p47-1 y que incluye la secuencia de nucleótidos del gen Bde47A y de sus secuencias flanqueantes (secuencia depositada en las bases de datos con el número de acceso AM400897.1). La numeración de la secuencia nucleotídica se inicia en el primer nucleótido del codón de iniciación de la proteína deducida. Se indica también la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida resultante de la traducción de la única fase de lectura abierta que puede originar un RNA mensajero del tamaño detectado en las hibridaciones Northern llevadas a cabo y cuya ubicación fue determinada en estas mismas hibridaciones. Esta secuencia de aminoácidos está numerada desde el primer residuo de metionina (M).

12.4.a. La región estructural

La región estructural del gen Bde47A se inicia en la posición +1, en el primer nucleótido del triplete ATG que constituye el codón de iniciación del gen, y discurre hasta la posición +1131, en la que se encuentra el tercer nucleótido del codón de terminación TAA. Consta de dos exones de 564 y de 510 nucleótidos, respectivamente, separados por un intrón de 57 nucleótidos localizado entre las posiciones +565 y +621. El procesamiento de este intrón determina una fase de lectura de 1.074 nucleótidos, incluido el codón de terminación, que codifica una proteína deducida de 357 aminoácidos. La presencia de un intrón en el gen Bde47A se sospechó inicialmente al identificar tres codones de terminación, muy próximos entre sí y localizados en la zona correspondiente al intrón propuesto, que interrumpían la fase de lectura que se inicia en la posición +1 y encontrar, además, las secuencias consenso de los extremos 5' y 3' de intrones de hongos filamentosos en zonas flanqueantes a la zona en la que se encuentran estos tres codones de terminación. Para confirmar la presencia de un intrón en el gen Bde47A se amplificó mediante PCR la región codificante del mismo, comprendida entre las posiciones +1 y +1131, a partir tanto de la copia genómica como de la copia cDNA del gen. La copia genómica se amplificó utilizando como molde DNA genómico de *B. cinerea* y la copia cDNA utilizando como molde cDNA sintetizado mediante transcripción inversa de una muestra de RNA total de *B. cinerea* cultivado en medio líquido Gamborgs B5 suplementado con 10 mM sacarosa y 10 mM KH_2PO_4 . En ambos casos, para la amplificación de los correspondientes productos se utilizaron dos oligonucleótidos específicos:

- **EP47-C (5'-GACGGTACCTTGCAATA-3')**, cuya secuencia coincide con la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones -98 y -82 de la cadena sin sentido del gen Bde47.
- **EP47-D (5'-GGGGAAAACGGGATGAC-3')**, cuya secuencia es complementaria de la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1181 y 1197 (numeración según se indica en la secuencia anteriormente mostrada) de la cadena sin sentido del gen Bde47.

```

1          10          20          30          40          50
| SaI      |          |          |          |          |
-535 GTCGACCTGGCACGACCTGGCACGACCTGGCAGAACACACGACAGGGCAC
-485 CGTTGCTCACAGCTGCTCAGTGTCCCAAGCTGGAGCTCCCACGATGACG
-435 TATGAAAATATATCTTTCTTCGGATTCTGTTCCCAAGCCATTACGAAACA
-385 GCTTGTCTTGGGATCCATAGTTGCCGGTATCACACTTTTCGCGGGAATCG
-335 ATCGAATAGATACAATTTGGTCTATCTCATATGTAATTGTTCCACACAAA
-285 GCCAATAAATAAGCTGCCGCCATTCGATTTTCCCGGTTTGTTCCCTCGC
-235 TGTTTACTAATTACCTAGACAGTTATTAGTCTACAAGTACAAGTACAAGT
-185 CCGGTCTTCCCTCTCCATTCCTCCTTTCTACTTTTTTCTCGTACACAAAC

                                     KpnI
-135 TTGCCCAATACCTCCTTGATTTATTGAATTTCTGATTGACGGTACCTTGCG
-85  AATATACCCATTTGTACCAATTGCACTCTTGAACATCGCATTATAAATAAA
-35  TAACCGCGGGGTAAGGTGTTGTAGAAACCAAGACC
+1   ATGCTTCGCACAACAGCGACACGCTCTCTCTTGAAGAGCTTCACAAAAC
      M L R T T A T R S L L K S F T K L
+51  TCCCACCTCTCGAGCAAGCTATTCTCAAGCTTCCGCAGCTCTCAAAAATA
      P T S R A S Y S Q A S A A L K N
+101 CCTCTTCTTTCCGCACATCAATCTCCAAACGCCCTGCAACCCTCTCTTCC
      T S S F R T S I S K R P A T L S S
+151 CGTCTCTTCTATGCCACCAAATCCGAACCTCCTTACCTCCCCGACGAAAT
      R L F Y A T K S E P P Y L P D E I
+201 AAATTTCAAAGAAGAAGAAAAGATCGCAAACAAACAATCGAACCTCACC
      N F K E E E K I A K Q T I E P H
+251 CCGAATCCGTATCATCAGTCCCTCCGTTTCGTCTGTTTCGAGGAAAAC
      P E S V S S Q S S V R P V F E E N
+301 CCACACCACGAAGGCCACGGATCGGTCAAAGATGATTTGGAAACTATCAA
      P H H E G H G S V K D D L E T I K
+351 GGAAACATTTGCTCTACGGGAGGTTCCCAAGGAATCTTTGATAATTGGTG
      E T F A L R E V P K E S L I I G
+401 CTGCGGGTGTTTTACCTTATGCTGCTACATCGGCTTCTACAGTGTATTTG
      A A G V L P Y A A T S A S T V Y L
+451 GCTTACGATATCAATCAAGCAAACGCTACTGGACAAGGCATCTTATTTTC
      A Y D I N Q A N A T G Q G I L F S
+501 ACCCGAGACGGCTCACCAATTGTTGGAGTATATTACACCTATTCAAGTTG
      P E T A H Q L L E Y I T P I Q V
+551 GATATGGTGCTGTTgtaagttccttttcccggttctaaatcgccaaacta
      G Y G A V
+601 taactaaaacttgatacatagATCATTTCCTTCCCGGTGCAATTCCTG
      I I S F L G A I H W
+651 GGGTCTTGAATATGCAGGTTATGGAGGACATCACAGCTACCGTGCATACA
      G L E Y A G Y G G H S Y R R Y
+701 TGATCGGAGTTGTTGCTCCTGCTGCTGCATGGCCTACTATACTTATGCCA
      M I G V V A P A V A W P T I L M P
+751 GTGGAATACGCGTTAATTACCCAATTCACCGCTTTCACATTCTCTATTT
      V E Y A L I T Q F T A F T F L Y F

```


Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

```
+801 CGCAGATGCCCGAGCAACAGTTCGAGGATGGTGTCTCCCTGGTACAGCA
      A D A R A T V R G W C P P W Y S
+851 CATATAGATTTGTCTTGACATTTATTGTGGGAGCGGCGATTGTGGCAAGT
      T Y R F V L T F I V G A A I V A S
+901 TTGGTCGGTAGAGGAAGATTGTCAGCCATGATAGACAATTGAGAAGTGC
      L V G R G R I V S H D R Q L R S A
+951 AGTTGATTATGTCAAGGAAGACAGAGATGGTCAGTGGATAGCATTGGAAC
      V D Y V K E D R D G Q W I A L E
+1001 AGGAGGAGAAGATGAGAAGGGCGAAGTTGGCTGAAGAGGAGAAGGCCGGAT
      Q E E K M R R A K L A E E E K A D
+1051 GAGGAGGAGGAGGCACAGGATGAATCCGGAGATGAGGAGGAGAGTGATAA
      E E E E A Q D E S G D E E E S D N
+1101 TGAAGAAGAGAAGAAGGATGAGAAGAAGTAA
      E E E K K D E K K -
+1132 ATTAGCATCCGAGTTTGTACATATCTACTTTCTCTCCATCTGCCTTCGTC
      ▼
+1182 ATCCCGTTTTTCCCCGGATAAATTAATGTCTGATATCACTTCGGCTTCAAT
+1232 TCAAATTAATCCATTTATGCAGAAGTATTTTCTAGTATATAGCAAGTTAT
+1282 CAAATGTACAGAAAAAAAAAATCAATAATGTCTCGTCACCATGATATCAG
+1332 AGCTCTAGTGAAGTATCTTTTAAGCTGCCATTCTCTCTTTGAACTAAAC
+1382 CTCCAAGGGAAAACCGGCCTTCTCAACCACCACTCACAGAATTC
```

Figura 12.7

Secuencia de nucleótidos perteneciente al fragmento *SalI-EcoRI* de 1.960 nt.

Los dos productos amplificados fueron secuenciados y las correspondientes secuencias comparadas. Dicha comparación demostró que en la copia cDNA no está presente la secuencia correspondiente al intrón propuesto entre las posiciones indicadas. Este intrón presenta una estructura que responde con exactitud a la estructura de los intrones de genes eucariotas en general y de hongos filamentosos en particular. Así, en su extremo 5' el intrón está flanqueado por la secuencia GTAAGT, que se ajusta perfectamente a la secuencia consenso de procesamiento del extremo 5' descrita en hongos filamentosos (GTPuNGT) (donde Pu representa un nucleótido púrico) (Gurr *et al.* 1987; Rambossek *et al.* 1987) y a la secuencia consenso típica de eucariotas superiores (GTAAGT) (Lerner *et al.* 1980), y en su extremo 3' el intrón presenta la secuencia TAG, que responde a la secuencia consenso del extremo 3', NAG (N representa cualquier nucleótido) en eucariotas superiores (Mount 1982), y PiAG (Pi representa cualquier nucleótido pirimidínico) en hongos filamentosos (Gurr *et al.* 1987; Rambossek *et al.* 1987).

Como grupo colaborador que forma parte del consorcio internacional de laboratorios que han participado en el proyecto de secuenciación y anotación del genoma de *B. cinerea* y de *S. sclerotiorum* tuvimos acceso a la información del genoma de las tres cepas analizadas una vez se generó el primer ensamblaje y la primera anotación automática de cada genoma. Utilizando la información de la secuencia determinada manualmente por nuestro grupo pudimos comprobar que en la cepa *B. cinerea* B05.10 existe una única copia del gen Bde47A, confirmando nuestras observaciones de-

rivadas del análisis Southern, y que la misma situación se presenta en la cepa *B. cinerea* T4 y en *S. sclerotiorum*. Los códigos de los genes identificados en la anotación automática son:

<i>B. cinera</i> B05.10:	BC1G_09402.1
<i>B. cinerea</i> BofuT4:	BofuT4_P148430.1
<i>S. sclerotiorum</i> :	SS1G_05730.1

En los tres organismos la anotación propuesta coincide con la anotación que proponemos nosotros teniendo en cuenta el análisis llevado a cabo sobre la secuencia determinada experimentalmente en nuestro laboratorio.

12.4.b. Análisis de la región promotora

La secuencia de la región 5' no codificante del gen Bde47A determinada en este estudio incluye 535 nucleótidos. Los análisis de hibridación tipo Northern llevados a cabo para ubicar con precisión la región de DNA que se transcribe para dar lugar al RNA mensajero de aproximadamente 1,4 kb de tamaño demostraron que el inicio de transcripción del gen Bde47A se encuentra próximo al sitio de restricción *KpnI* (sitio situado a 95 nucleótidos del codón de iniciación), y entre éste y el sitio *SalI* del fragmento de DNA clonado en el plásmido p47-1. Esta observación permite estimar el tamaño de la región 5' transcrita pero no traducida del gen Bde47A, que debe tener un tamaño ligeramente superior a los 100 nucleótidos (probablemente entre 125 y 150 nucleótidos).

En esta región 5' no codificante del gen Bde47A se encuentran secuencias que se ajustan con precisión a la secuencia de elementos relacionados con el control de la expresión génica en organismos eucariotas, concretamente con secuencias implicadas en el proceso de transcripción y su regulación. Las caja "TATA" aparecen delante del origen de transcripción en la gran mayoría de los promotores de genes eucarióticos descritos e intervienen en el reconocimiento por parte de la RNA polimerasa II del origen de transcripción (Sentenac y May, 1981; Dobson *et al.*, 1982). Varias copias de la secuencia "TATA" aparecen en la región promotora del gen Bde47A. Sin embargo, sólo aquella identificada entre las posiciones -427 a -424 se localiza en una región anterior al origen de transcripción y puede, por lo tanto, ser funcional. Las otras dos copias aparecen entre las posiciones -83 a -80 y -45 a -42, respectivamente, después del origen de transcripción (que se debe encontrar aguas arriba alrededor del sitio *KpnI*) y formando parte ya de la región transcrita del RNA mensajero. También aparecen en la región promotora del gen Bde47A varias copias de la secuencia "CAAT" (posiciones -130 a -127; -86 a -83; -68 a -65), cuya presencia es frecuente en los promotores de genes eucariotas, si bien su función en el proceso de transcripción aún no ha sido clarificada.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Se analizó posteriormente la secuencia promotora buscando otros motivos o elementos de regulación particulares basándonos en la identificación de secuencias de unión de factores de transcripción haciendo uso del programa MatInspector (Cartharius *et al.* 2005). Los resultados de las familias de factores de transcripción para los cuales se encuentran motivos de unión en la región promotora del gen Bde47A identificadas con este programa se muestran en la Tabla 12.I.

Familia	Localización	Ratio	Secuencia
General transcription factor IID, GTF2D	8-46 (-)	0.723	cctgtcgtgtgttctgccaggctgtgcca- g GTCG tgcca
General transcription factor IID, GTF2D	35 - 63 (-)	0.723	gcactgagcagctgtgagcaacggt- gccct GTCG gtgtg
General transcription factor IID, GTF2D	67 - 105 (+)	0.712	tcagtgtctccaagctggagctccac- gat GACG atga
Core promoter motif ten elements	194 - 214 (+)	0.786	ggaatcg ATCG aatagataca
<i>Asperg./Neurospora</i> -activ.of genes induced by nitrogen	206 - 212 (-)	1.000	TATC tat
<i>Asperg./Neurospora</i> -activ.of genes induced by nitrogen	223 - 229 (+)	0.994	TATC tca
Pheromone response elements	235 - 247 (-)	0.870	gtgtgg AACA aatt
Yeast CCAAT binding factors	247 - 259 (-)	0.907	caaag CCA Aaat
Activator of cytochrome C	273 - 287 (-)	0.801	ccgggaaa ATCG aat
Yeast activator of glycolytic genes	275 - 291 (+)	0.791	tcgatttt CCCG gtttg
Activator of cytochrome C	349 - 363 (-)	0.826	gaggaag ACCG gac
<i>Aspergillus</i> spore/developmental regulator	360 - 374 (+)	0.984	cctctc CATT cctcc
Yeast heat shock factors	385 - 395 (+)	0.856	t TTCT cgta
Plant TATA binding protein factor	487 - 507 (-)	0.966	cgca TATA aataaat
<i>Neurospora crassa</i> QA1 gene activator	488 - 504 (+)	0.806	g cggttatttatTTAT atg cg
Yeast GC-Box Proteins	497 - 513 (+)	0.928	taaataaccgc GGGG Gta
RDNA binding factor	507 - 515 (-)	0.861	ctt ACCC cg

Familia	Localización	Ratio	Secuencia
Yeast GAL4 factor	537 - 561 (-)	0.766	gagcgtgtcgcgtgttGCGAagca
<i>S.cerevisiae</i> , XhoI site-binding protein I	592 - 604 (+)	0.885	ctcTCGAagcaagc
Yeast mating factors	645- 655 (-)	0.931	tGATGtgcgga

Tabla 12.I
Resultados obtenidos analizando la región promotora del gen Bde47A con el programa MatInspector.

12.4.c. Análisis de la región 3' flanqueante

La secuencia mostrada en la Figura 12.6 muestra también la secuencia correspondiente a la región 3' no codificante del gen Bde47A y que incluye 294 nucleótidos. La comparación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA clonado en el plásmido p47-1 con la secuencia del fragmento de cDNA correspondiente al fragmento de “differential display” ddB47, que de acuerdo con el principio de esta metodología debe representar el extremo 3' de un RNA mensajero, y la consideración de la ubicación y orientación del cebador reverso RT1 utilizado para amplificar este fragmento de cDNA, permiten determinar la posición exacta del sitio de poliadenilación del gen Bde47A. La Figura 12.5 presenta dicha comparación y en la misma se indica la posición del sitio de poliadenilación. Debemos recordar que con el método de “differential display” en una primera fase se sintetizan, mediante transcripción inversa, subpoblaciones de cDNA cuya constitución dependerá de la naturaleza de los cebadores reversos utilizados. Habitualmente se utiliza una colección de 12 cebadores reversos, denominados “cebadores anclados”, constituidos en cada caso por 11 residuos de timidina y dos nucleótidos adicionales en el extremo 3' del cebador. En la última posición del cebador puede aparecer cualquiera de los cuatro nucleótidos, mientras que en la penúltima posición puede aparecer cualquier nucleótido excepto timidina. Con estos cebadores reversos se sintetizan 12 subpoblaciones de cDNA, cada una de las cuales incluye aquellos cDNAs derivados de los RNA mensajeros que poseen cada una de las 12 combinaciones posibles en los dos nucleótidos inmediatamente previos a la cola de poly-A. Luego, en una segunda fase, la metodología de “differential display” propone llevar a cabo reacciones de PCR utilizando como molde cada una de estas subpoblaciones complejas de cDNA y como cebadores dos oligonucleótidos diferentes: el mismo cebador reverso utilizado en la reacción de síntesis de cDNA y un cebador de pequeño tamaño, generalmente un decámero. Utilizando un número suficientemente grande de decámeros en combinación con

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

cada primer reverso es posible garantizar que se amplificarán fragmentos de cDNA que representen, en su conjunto, todos los genes que se están expresando en unas condiciones dadas y en un momento dado. En nuestro caso, el primer reverso utilizado para amplificar el fragmento “ddB47” tenía la secuencia T₁₁GG. La posición del sitio de poliadenilación es la posición 1.730 en la Figura 12.5. Por lo tanto, teniendo en cuenta la numeración establecido a partir del primer nucleótido del codón de iniciación del gen Bde47A, que se presenta en la secuencia de la sección 12.4, el RNA mensajero que resulta de la transcripción del gen Bde47A presenta una región 3’ transcrita pero no traducida, y previa a la cola de poliA (el sitio de poliadenilación en esta secuencia está indicada con ▼), de un tamaño de 64 nucleótidos. El tamaño total de la región 3’ del RNA mensajero dependerá de la longitud de la cola de poliA añadida postranscripcionalmente, cuyo tamaño no ha sido determinado. En esta región no aparece ninguna secuencia que responda con exactitud a la secuencia consenso señal de poliadenilación de genes eucarióticos “AATAAA” (Proudfoot y Brownlee, 1976; Berget, 1984). No obstante, de los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que el gen Bde47A es transcrito y procesado correctamente.

12.4.d. La proteína deducida

Teniendo en cuenta el tamaño de la región codificante del gen Bde47A (1.074 nt), el tamaño de la región 5’ transcrita pero no traducida (entre 125 y 150 nt) y el tamaño de la región 3’ transcrita pero no traducida (64 nt), el tamaño esperado del RNA mensajero del gen Bde47A, sin contar con el tamaño de la cola poliA del mismo (no determinado), es de aproximadamente 1.250-1.300 nt. Si consideramos una cola poliA de entre 100 y 150 nt, el tamaño esperado del RNA mensajero del gen Bde47A se ajusta con precisión al tamaño del RNA mensajero detectado mediante hibridación (1,4 kb).

La fase abierta de lectura del gen Bde47A codifica una proteína deducida de 357 aminoácidos, un peso molecular de 39.931,8 y un punto isoeléctrico teórico de 5,36 y cuya composición en aminoácidos se presenta en la Tabla 12.II

Una búsqueda bioinformática de posibles dominios funcionales mediante comparación de la secuencia deducida de la proteína BDE47A con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas no permitió detectar ninguna similitud con algún dominio funcional descrito en proteínas ya caracterizadas. Esto nos indica que muy probablemente estamos ante un tipo nuevo de proteína que no ha sido descrito previamente, y que hasta el momento no se han caracterizado proteínas homólogas en otros organismos.

Aminoácido	cantidad	%	Aminoácido	cantidad	%
Ala (A)	38	10.6%	Leu (L)	26	7.3%
Arg (R)	20	5.6%	Lys (K)	10	5.3%
Asn (N)	6	1.7%	Met (M)	4	1.1%
Asp (D)	14	3.9%	Phe (F)	14	3.9%
Cys (C)	1	0.3%	Pro (P)	18	5.0%
Gln (Q)	12	3.4%	Ser (S)	31	8.7%
Glu (E)	37	10.4%	Thr (T)	24	6.7%
Gly (G)	20	5.6%	Trp (W)	5	1.4%
His (H)	9	2.5%	Tyr (Y)	17	4.8%
Ile (I)	21	5.9%	Val (V)	21	5.9%

Tabla 12.II

Resumen de la composición de aminoácidos de la proteína codificada por el gen Bde47A.

Dado que no existen secuencias homólogas previamente caracterizadas, debido a la ausencia de homologías con dominios funcionales previamente descritos, no podemos inferir información alguna sobre la posible función de la proteína a partir de la información generada en otros sistemas. Por este motivo, decidimos entonces profundizar en el estudio y en la caracterización de la estructura de la proteína utilizando herramientas bioinformáticas.

En primer lugar se analizó la presencia o no de dominios transmembranales en la proteína BDE47A mediante la utilización del servidor TMHMM Server v. 2.0 (Technical University of Denmark). La anotación automática del gen Bde47A en las dos cepas de *B. cinerea* y del gen homólogo en la cepa de *S. sclerotiorum* cuyo genoma ha sido analizado propone la existencia en la proteína deducida derivada de cuatro dominios transmembranales, dominios detectados y confirmados por

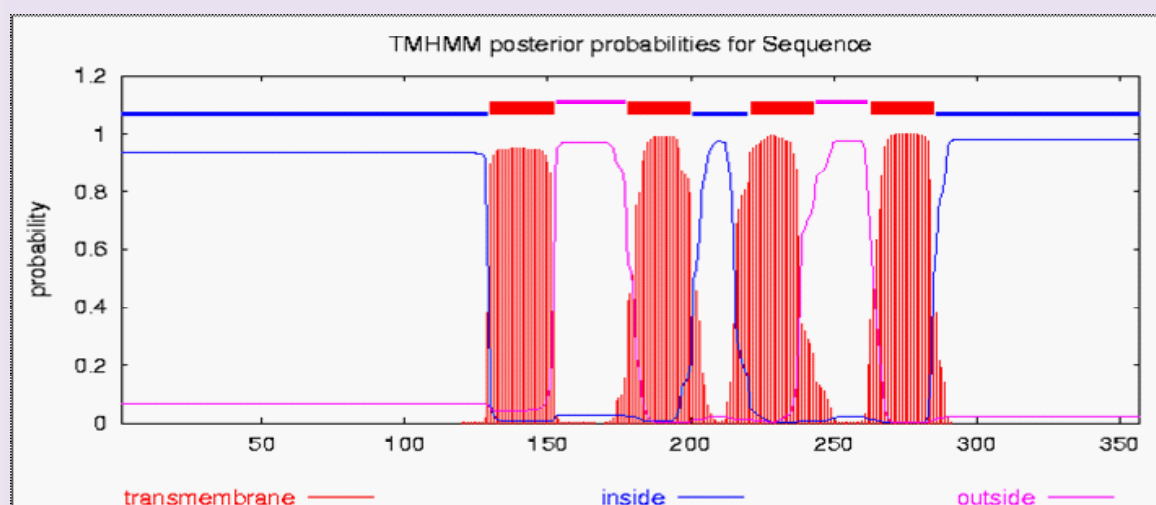


Figura 12.8

Esquema de la posible localización de los dominios transmembranales de la proteína BDE47A

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

el programa antes mencionado. En la figura 12.8 se muestra una representación de la localización de los dominios transmembranales identificados.

Tratándose de cuatro dominios transmembranales que ocupan posiciones localizadas en la zona central de la proteína, el modelo de organización de la proteína que se propone implica la existencia de tres regiones inter-segmentos transmembranales y de dos regiones terminales, la inicial y final. Ambas regiones terminales presentan la misma orientación, dirigidas hacia el “interior” del espacio delimitado por la membrana en la que la proteína se encuentra embebida, según el modelo propuesto. La Tabla 12.III muestra las posiciones exactas de los límites de cada segmento.

Secuencia	Posición
interior (extremo amino)	1 - 129
Hélice TransMembrana 1	130 - 152
exterior	153 - 177
Hélice TransMembrana 2	178 - 200
interior	201 - 220
Hélice TransMembrana 3	221 - 243
exterior	244 - 262
Hélice TransMembrana 4	263 - 285
interior (extremos carboxilo)	286 - 357

Tabla 12.III

Posiciones de los dominios transmembranales identificados en la proteína BDE47A

El análisis del perfil de hidrofobicidad de la proteína deducida, mediante el uso de diversas herramientas del servidor Expasy, reforzó la idea del modelo propuesto de los cuatro dominios transmembranales propuesto por el servidor THMM y aceptada por nosotros. En la figura 12.9 se presenta el perfil de hidrofobicidad de la proteína deducida, donde se observan 4 picos que sobrepasan la

línea roja y que corresponden a los cuatro dominios transmembranales descritos anteriormente.

Es posible proponer, por lo tanto, que la proteína BDE47A es una proteína de membrana. Para determinar si la proteína es dirigida a la membrana nuclear o a la membrana de algún orgánulo subcelular, se llevó a cabo un análisis de la localización subcelular de la proteína con ayuda del servidor TargetP 1.1 (Technical University of Denmark). El análisis llevado a cabo propone

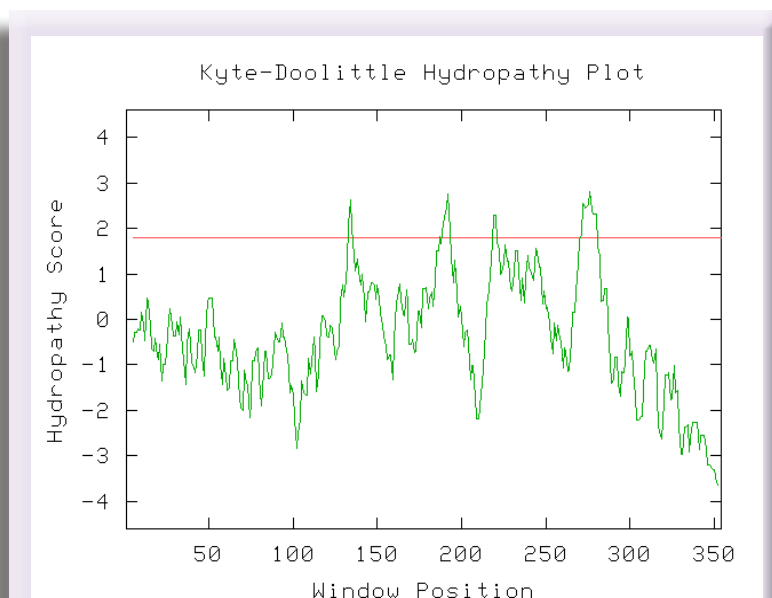


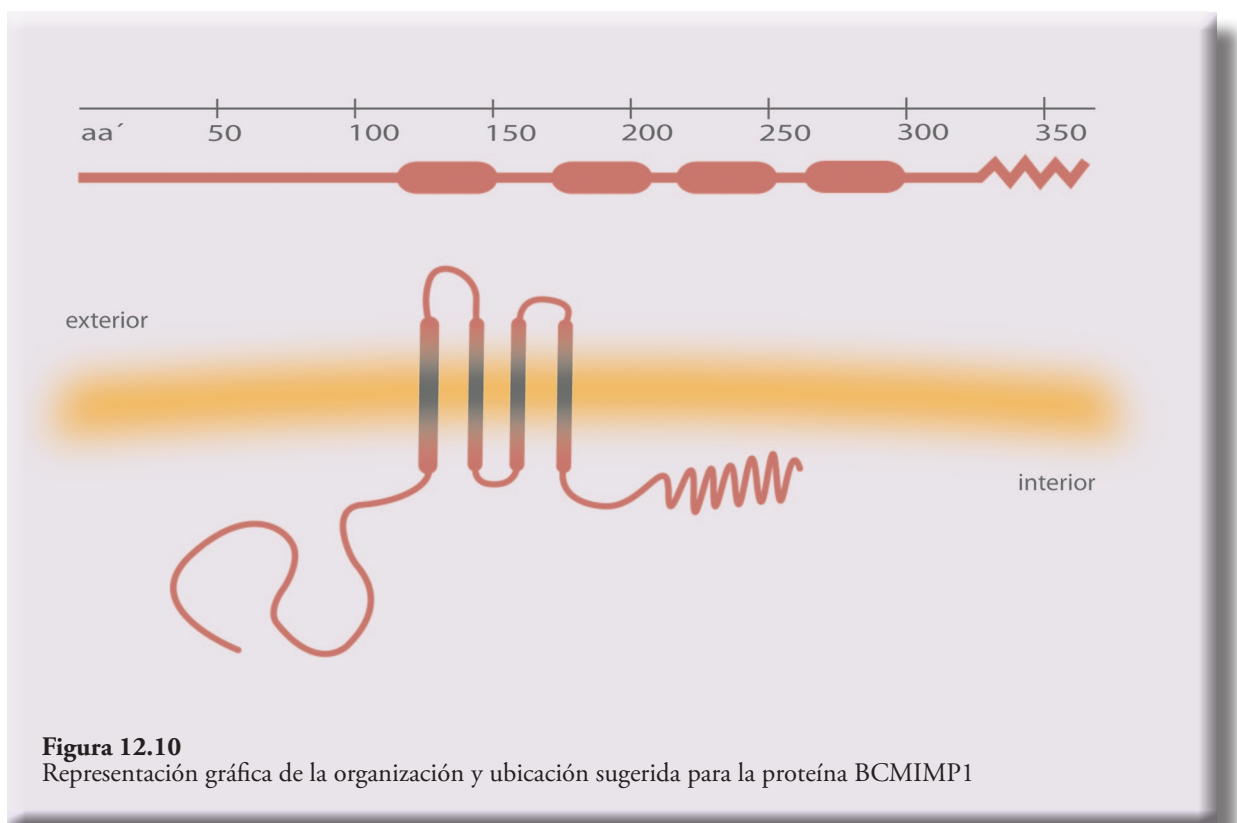
Figura 12.9

Perfil de hidrofobicidad deducido para la proteína BDE47A

que la proteína BDE47A tiene una localización mitocondrial con una probabilidad de 0,917. Resultados muy similares fueron obtenidos con el programa PSORT a través del servidor ExPASy. Este programa propone que se trata de una proteína anclada en la membrana interna mitocondrial con una probabilidad del 0,900 e identifica y ubica una posible secuencia de localización mitocondrial, la secuencia SRLFYA, alrededor de la posición 53 de la misma.

Es interesante destacar, finalmente, que el extremo carboxilo de la proteína presenta un marcado carácter ácido debido a la presencia de un elevado número de residuos de ácido glutámico (E), característica que nos puede proporcionar información sobre su función.

La información recopilada hasta el momento nos permitió realizar y proponer un esquema de la organización estructural de la proteína y su posición en la mitocondria, mostrada en la Figura 12.9. Además, toda esta información también nos permitió renombrar la proteína como Proteína de la membrana interna mitocondrial de *Botrytis cinerea* número 1 ó BCMIMP1 (*Botrytis cinerea* Mitochondrial Inner Membrane Protein #1).



Aunque no se detectan homologías significativas con proteínas previamente caracterizadas o con dominios funcionales de proteínas previamente descritos, sí es posible identificar secuencias homólogas en el genoma de otros organismos. La búsqueda de homologías mediante un análisis de

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

tipo BLASTP a través del servidor del NCBI sobre la base de datos “non-redundant protein sequences (nr)” permite identificar secuencias relacionadas en el genoma de algunos hongos y bacterias y en un número muy reducido de plantas y animales. La mayor parte de las secuencias detectadas son secuencias identificadas en el curso de la anotación automática del genoma de diferentes especies de hongos, apareciendo en todos los casos la secuencia identificada como “secuencia de proteína putativa” o “proteína hipotética”. En ningún caso se detecta homología con secuencias previamente caracterizadas.

La Tabla 12.IV presenta un listado de las secuencias que el análisis BLASTP indicado ha permitido detectar y que presentan un e-valor $< 1e-03$. En total son 49 secuencias, 41 procedentes de organismos eucariotas y 7 de bacterias. Entre las secuencias de eucariotas, 38 son de hongos (Basidiomicetes, Ascomicetes y Ascomicetes Onygenales), 2 de plantas verdes y 2 de animales (un cnidario y un equinodermo).

Secuencias que presentan un alineamiento significativo	Score	E valor
ref XP_001552061.1 hyp. Prot. BC1G_09402 [Botryotiniafuckeliana B05.10] Asc	733	0.0
ref XP_001592809.1 hyp. Prot. SS1G_05730 [Sclerotiniasclerotiorum 1980] Asc	600	6e-170
gb EEP80463.1 conserv. hypoth. protein [Uncinocarpusreesii 1704] Asc	278	6e-73
gb EDP50521.1 conserv. hypoth. protein [Aspergillusfumigatus A1163] Asc	273	2e-71
ref XP_751675.1 conserv. hypoth. protein [Aspergillusfumigatus Af293] Asc	273	2e-71
ref XP_001266874.1 hyp. Prot. NFIA_104650 [Neosartoryafischeri NRRL 181]Asc	272	4e-71
gb EER23516.1 hyp. Prot.CPC735_048860 [Coccidioidesposadasii C735SOWgp] Asc	271	8e-71
gb EEQ72237.1 conserv. hypoth. protein [Ajellomycesdermatitidis SLH14081] AOn	271	1e-70
gb EEH08105.1 conserv. hypoth. protein [Ajellomycescapsulatus H143] AOn	271	1e-70
ref XP_001247812.1 hypoth. protein CIMG_01583 [Coccidioidesimmitis RS] AOn	270	2e-70
gb EER39813.1 conserv. hypoth. protein [Ajellomycescapsulatus H143] AOn	269	3e-70
gb EEH40746.1 conserv. hypoth. protein [Paracoccidioidesbrasiliensis Pb01] AOn	268	5e-70
ref XP_001544501.1 conserv. hypoth. protein [Ajellomycescapsulatus NAm1] AOn	268	6e-70
gb EEH45602.1 conserv. hypoth. protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18] AOn	267	2e-69
gb EEQ33515.1 conserv. hypoth. protein [Microsporumcanis CBS 113480] AOn	265	4e-69
ref XP_001272017.1 conserv. hypoth. protein [Aspergillusclavatus NRRL 1] Asc	265	4e-69
ref XP_002341730.1 conserv. hypoth. protein [Talaromycesstipitatus ATCC 10500] Asc	264	9e-69
ref XP_001213102.1 conserv. Hypoth. protein [Aspergillusterreus NIH2624] Asc	261	1e-67
ref XP_001401858.1 hypoth. protein An04g04940 [Aspergillusniger] Asc	259	2e-67
ref XP_663184.1 hypoth. protein AN5580.2 [Aspergillusnidulans FGSC A4] Asc	259	3e-67
ref XP_002151302.1 conserv. hypoth. protein [Penicilliummarneffeii ATCC 18224] Asc	259	4e-67
ref XP_001804512.1 hypoth. protein SNOG_14318 [Phaeosphaerianodorum SN15] Asc	258	5e-67
gb EEH20970.1 conserv. hypoth. protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03] Asc	256	2e-66
ref XP_001932994.1 cons. hypoth. protein [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP] Asc	251	1e-64

Secuencias que presentan un alineamiento significativo	Score	E valor
ref XP_960098.1 hypoth. protein NCU05838 [Neurospora crassa OR74A] Asc	248	6e-64
ref XP_002564640.1 Pc22g06080 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255] Asc	247	2e-63
gb EEU48297.1 hyp.protNECHADRAFT_99046[Nectria haematococca mpVI77-13-4] Asc	243	2e-62
ref XP_001904472.1 unnamed prot. product [Podospora anserina] Asc	237	1e-60
ref XP_001408751.1 hypoth. protein MGG_12800 [Magnaporthe grisea 70-15] Asc	234	1e-59
ref XP_390705.1 hypoth. protein FG10529.1 [Gibberella zeae PH-1] Asc	226	2e-57
ref XP_001228763.1 hyp. prot. CHGG_02247 [Chaetomium globosum CBS 148.51] Asc	192	4e-47
ref XP_761743.1 hypothetical protein UM05596.1 [Ustilago maydis 521] Bas	162	5e-38
ref XP_001886116.1 predicted protein [Laccaria bicolor S238N-H82] Bas	161	1e-37
ref XP_001832926.1 hyp. prot CC1G_12295 [Coprinopsis cinerea okayama7#130] Bas	152	4e-35
ref XP_571904.1 hyp. prot. CNG01760 [Cryptococcus neoformans var. Neof. JEC21] Bas	132	4e-29
ref XP_774321.1 hyp. prot CNBG3020 [Cryptococcus neoformans var. neof.B-3501A] Bas	131	1e-28
ref XP_001820169.1 hypoth. protein [Aspergillusoryzae RIB40] Asc	97.1	3e-18
ref XP_002374264.1 hypoth. protein AFLA_027540 [Aspergillusflavus NRRL3357] Asc	87.0	3e-15
ref YP_002298605.1 hypothetical protein RC1_2407 [Rhodospirillumcentenum SW] APr	62.4	7e-08
ref YP_002513464.1 glutaredoxin [Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7] GPr	61.2	1e-07
ref XP_002505369.1 predicted protein [Micromonas sp. RCC299] VCh	55.5	1e-05
ref XP_791059.1 PREDICTED: hypoth. protein [Strongylocentrotuspurpuratus] Ech	54.7	2e-05
ref YP_001187662.1 hypoth. protein Pmen_2170 [Pseudomonas mendocina ymp] GPr	53.5	3e-05
emb CAM75541.1 cons. hyp. prot. [Magnetospirillumgryphiswaldense MSR-1] APr	52.8	6e-05
ref YP_001789303.1 hypoth. protein Lcho_0263 [Leptothrixcholodnii SP-6] BPr	52.0	9e-05
ref ZP_03689988.1 hypoth. protein TK90DRAFT_1955 [Thioalkalivibrio sp. K90mix] GPr	51.6	1e-04
ref XP_001632664.1 predicted protein [Nematostella vectensis] Cni	50.8	2e-04
ref XP_001692925.1 predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii] VCh	50.4	3e-04
ref YP_002890909.1 hypothetical protein Tmz1t_3949 [Thauera sp. MZ1T] BPr	48.9	9e-04

Tabla 12.IV

Listado de secuencias homologas a la secuencia Bde47A detectadas mediante BLASTP. Asc=Ascomicete; AOn=Ascomicete Onygenales; Bas=Basidiomicete; APr=Aproteobacteria; BPr=Bproteobacteria; GPr=Gproteobacteria; Ech=Equinodermo; Cni=Cnidario; VCh=Vegetal Chlamydomonadales;

Un estudio del alineamiento de las secuencias correspondientes de hongos sugiere que las proteínas identificadas y, por lo tanto, los genes codificadores en las distintas especies, son ortólogos. La Figura 12.11 muestra el alineamiento de secuencias representativas de hongos. Debemos tener en cuenta que en la mayor parte de los casos las secuencias con las que trabajamos derivan del análisis llevado a cabo mediante anotación automática del genoma y que no han sido revisadas y corregidas manualmente. Podemos asegurar que tenemos garantías de la organización y estructura del gen Bde47A de *B. cinerea* (y de *S. sclerotiorum*) como consecuencia del trabajo experimental llevado a cabo por nuestro grupo. Es posible, por lo tanto, que en algunos casos la secuencia aminoacídica depositada en las bases de datos no sea del todo correcta.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

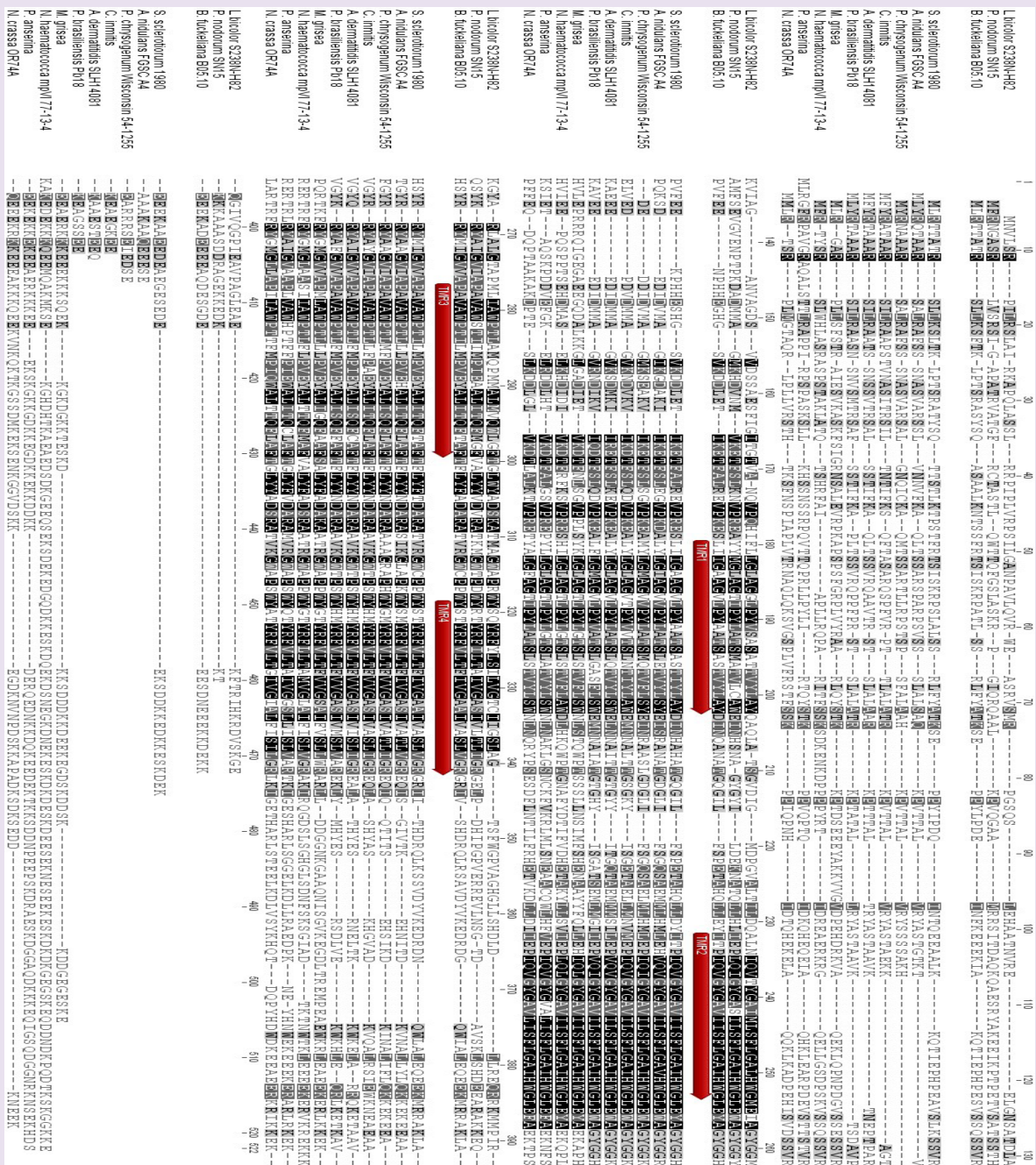


Figura 12.11
Alineamiento de la secuencia de la proteína BCMIMP1 con secuencias homólogas representativas de hongos.

Asumidas estas limitaciones, es posible comprobar que existe un elevado grado de similitud a lo largo de toda la longitud de la proteína entre las secuencias identificadas en hongos, estando particularmente conservadas las regiones transmembranales y observándose un importante grado de conservación en las secuencias correspondientes a las regiones inter-segmentos transmembranales (ver Figura 12.11). La conservación se extiende, aunque en menor medida, a la región amino-terminal de

la proteína. En la región carboxilo-terminal se observa en la mayoría de las secuencias una región rica en residuos de ácido glutámico, aunque existe variación en cuanto a la longitud de la misma.

Cuando se analiza en detalle el alineamiento de la secuencia de *B. cinerea* con las siete secuencias de origen bacteriano y con las dos secuencias derivadas de plantas verdes y las dos secuen-

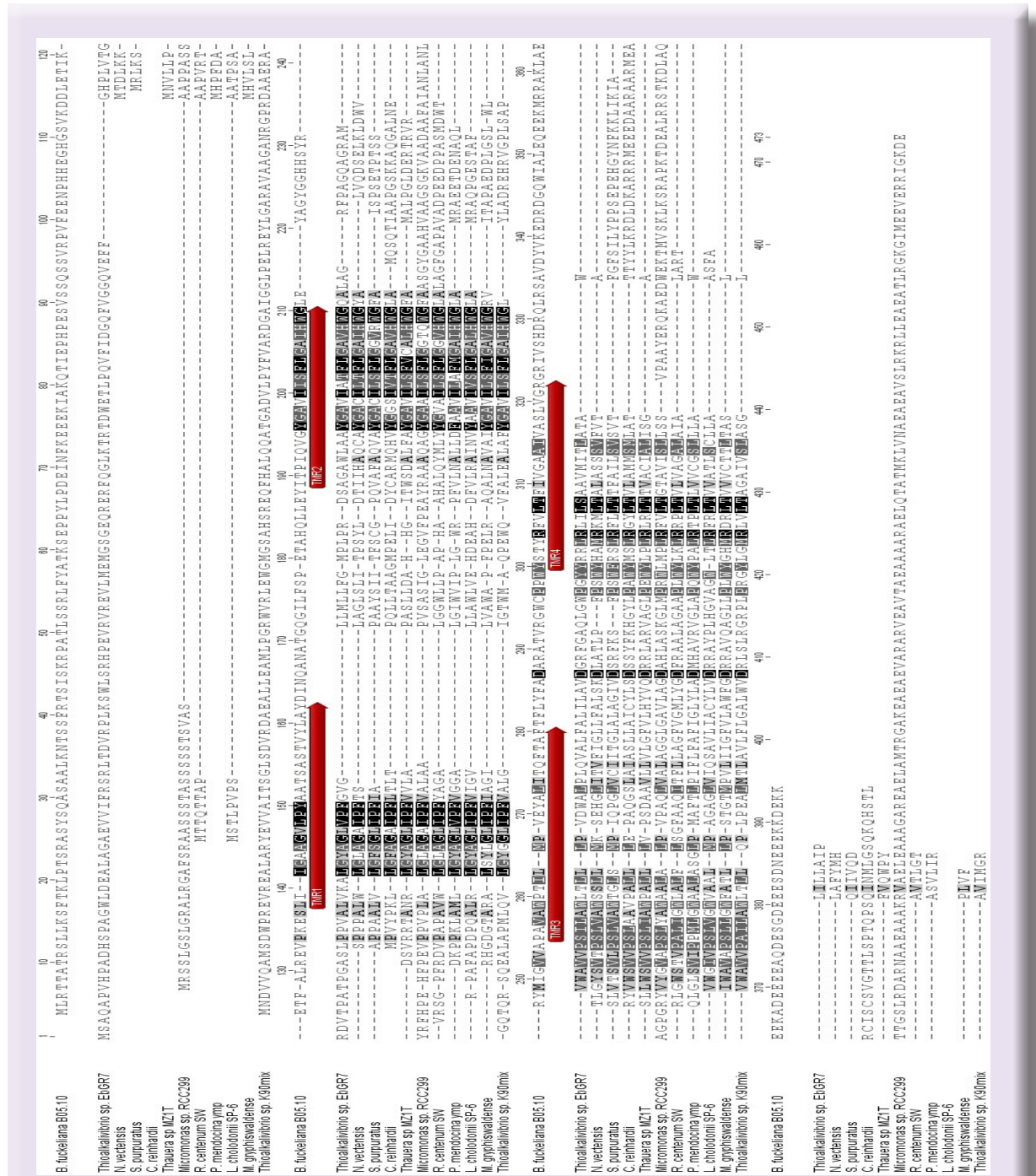


Figura 12.12 Alineamiento de la secuencia de la proteína BCMIMP1 con secuencias representativas de bacterias, algas y hongos.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

cias derivadas de animales es posible comprobar que el grado de similitud general es menor (Figura 12.12). En este caso, es posible detectar secuencias conservadas, pero estas se limitan estrictamente a las regiones transmembranales propiamente dichas, no siendo posible identificar residuos conservados correspondientes a las regiones “inter-segmentos transmembranales”. Tampoco se detecta homología alguna en la región correspondiente al extremo amino-terminal de las secuencias analizadas. En relación con el extremo carboxilo-terminal cabe destacar que ninguna de las secuencias estudiadas presenta una región rica en residuos de ácido glutámico.

Para estudiar la relación que puede haber entre la secuencia deducida del gen Bde47A y estas secuencias hipotéticas predichas en las bases de datos, se realizó un estudio filogenético entre ellas. Para ello se tomaron las secuencias de las proteínas con más de 100 correspondencias en su score y se analizaron en el servidor público Phylogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008) y con la aplicación bioinformática META.

La comparación de la secuencia deducida del gen Bde47A con estas proteínas depositadas en las bases de datos no dio ningún resultado mencionable. De toda esta información podemos inferir que la proteína BCMIMP1 no tiene relaciones filogenéticas con otras proteínas por ser la primera caracterizada de su tipo. En el futuro, con la caracterización y estudio de los productos génicos derivados de la secuenciación del genoma de *B. cinerea*, se podrá relacionar e incluir en nuevas familias proteicas a esta proteína.

13. Localización subcelular de la proteína BCMIMP1

El análisis de las secuencias de localización subcelular de la proteína codificada por el gen Bde47A indicaba que la proteína era dirigida a la mitocondria, concretamente a la membrana interna mitocondrial. Para comprobar que es así o, en su caso, determinar cuál es la auténtica ubicación subcelular de la proteína decidimos marcar la proteína con un marcador que nos permitiera localizar su emplazamiento en la célula.

13.1. Obtención de transformantes con GFP

Para poder localizar la proteína BCMIMP1 dentro de la célula, se procedió a una estrategia basada en el empleo de un marcador visual como es la Proteína Fluorescente Verde o GFP (*Green Fluorescent Protein*) detectable mediante microscopía (de fluorescencia y confocal). Con este objeto se procedió a la construcción de una fusión génica que permitiera expresar la GFP fusionada a la proteína BCMIMP1. Para ello se inició la construcción de un vector de expresión partiendo del plásmido p47-1, que contiene la región estructural del gen Bde47A clonada en el plásmido BlueScript II, y del plásmido pMCB15, que contiene una versión del gen que codifica la GFP de *Aequorea victoria* (Siemering *et al.* 1996; Cormack *et al.* 1997) que es funcional en hongos filamentosos (Fernández-Ábalos *et al.* 1998). Para fusionar el gen codificador de la proteína GFP (0,7 kb) al extremo 3' de la región codificante del gen *Bcmimp1*, determinando una fusión de la proteína GFP al extremo carboxilo de la proteína BCMIMP1, se diseñaron dos oligonucleótidos:

- **OF1 (oligonucleótido Fusión 1) (5'-GGATGCTGTCGACTTCCTTCTCATCCTTCTT-3')**, cuya secuencia es complementaria de la secuencia de la cadena sin sentido del gen *Bcmimp1* entre las posiciones 1.158 y 1.191 y con modificaciones que permiten eliminar su codón de terminación e introducir un sitio de restricción *SalI* que facilita la posterior clonación de la región estructural del gen codificador de la GFP en fase con aquél.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

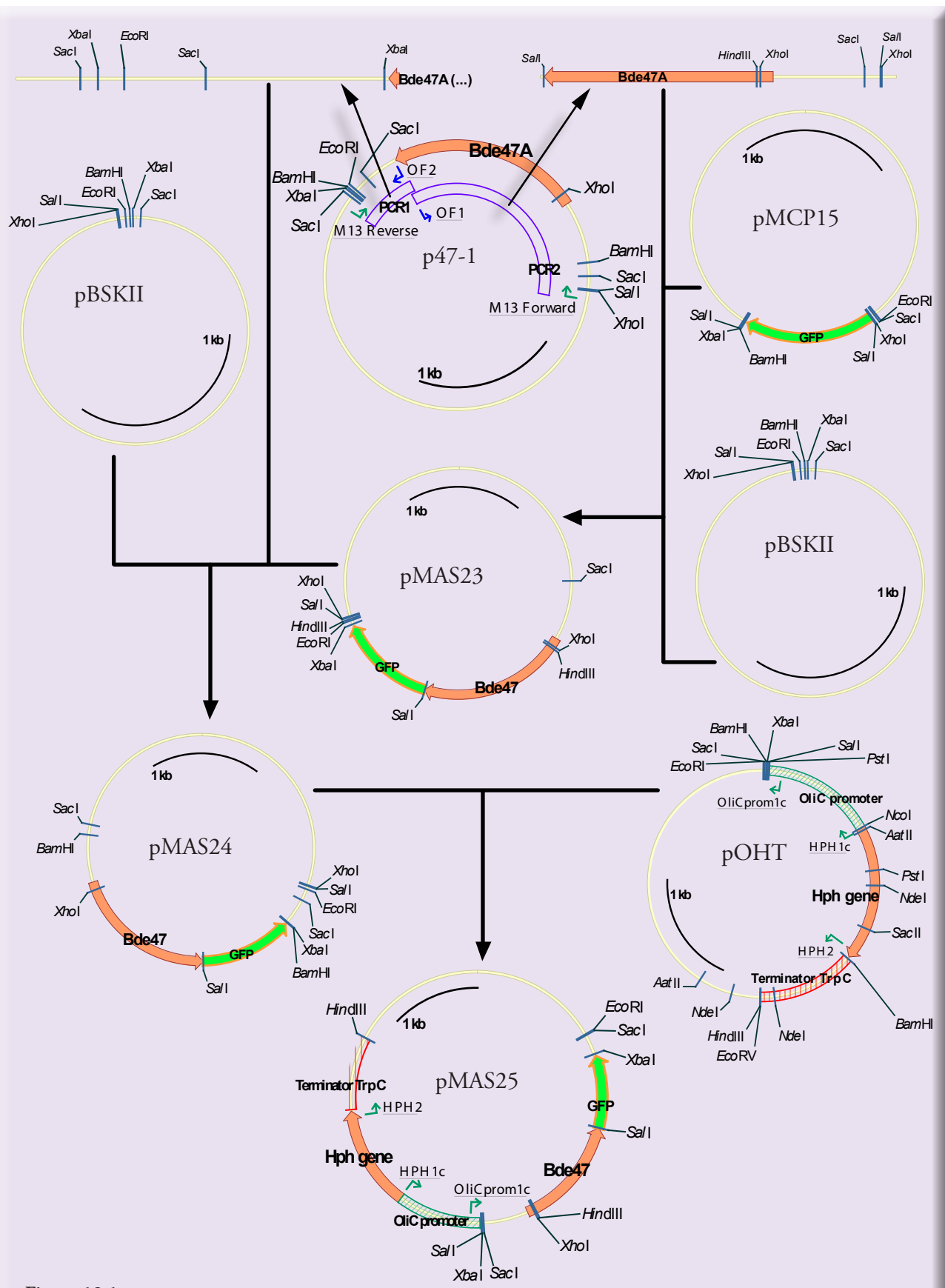


Figura 13.1
Construcción del plásmido pMAS25

- **OF2 (Oligonucleótido Fusión 2)** (5'-GATGAGTCTAGATAAATTAGCATCC-GAGTT-3'), cuya secuencia coincide con la secuencia de la cadena sin sentido del gen *Bcmimp1* entre las posiciones 1.167 y 1.196, y que permite introducir un sitio *XbaI* justo delante del codón de terminación natural del gen *Bcmimp1*.

La estrategia de clonación que fue utilizada para construir la fusión génica clonada en el plásmido pMAS25 se presenta en la Figura 13.1. En primer lugar se amplificó mediante PCR, utilizando como DNA molde DNA del plásmido p47-1 y como cebadores los oligonucleótidos M13 Forward y OF1, el fragmento de aproximadamente 1,8 kb de tamaño que incluye la región promotora y la región estructural del gen *Bcmimp1* clonadas en aquel plásmido. El fragmento fue digerido con *SacI* y con *SalI* y se purificó el fragmento *SacI-SalI* de aproximadamente 1,6 kb. La región estructural del gen codificador de la GFP fue obtenida como un fragmento *SalI-XbaI* de 746 nucleótidos mediante digestión con estas enzimas a partir del plásmido pMCP15. Ambos fragmentos fueron clonados en una ligación de tres fragmentos en el plásmido pBluescript SK+ digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI* dando lugar al plásmido pMAS23.

En segundo lugar, utilizando como molde el plásmido p47-1 y los oligonucleótidos M13 Reverse y OF2 se amplificó mediante PCR el fragmento de DNA que incluye la región terminadora del gen *Bcmimp1*. El fragmento fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI*, purificándose finalmente el fragmento con extremos *XbaI-EcoRI* que incluye los primeros 295 nucleótidos de la región terminadora del gen *Bcmimp1*. El plásmido pMAS23 fue digerido con las enzimas *SacI* y *XbaI* y se purificó el fragmento *SacI-XbaI* de aproximadamente 2,5 kb que incluye el promotor del gen *Bcmimp1* y su región estructural fusionada a la región estructural del gen codificador de la GFP. Los dos fragmentos purificados fueron clonados mediante una ligación de tres fragmentos en el vector pBluescript SK+ digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRI*, originando el plásmido pMAS24. A partir de este plásmido se purificó un fragmento *SacI-SacI* de aproximadamente 2,4 kb que incluye la fusión génica completa, ahora ya con las secuencias de la región terminadora del gen *Bcmimp1* a continuación del codón de terminación del gen codificador de la GFP. Este fragmento fue clonado en el plásmido pOHT, portador de la fusión génica que permite expresar la resistencia a higromicina en *B. cinerea*, dando lugar al plásmido pMAS25. El proceso de construcción del plásmido pMAS25, construcción resultante y necesaria para la transformación de *B. cinerea*, se muestra en la Figura 13.1.

Una vez generado el alelo fusión se introdujo en la estirpe silvestre de *B. cinerea* B05.10 mediante transformación de protoplastos mediada por PEG. Se obtuvieron varios transformantes y se seleccionaron inicialmente dos que fueron analizados mediante Southern (Figura 13.2). El objetivo

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

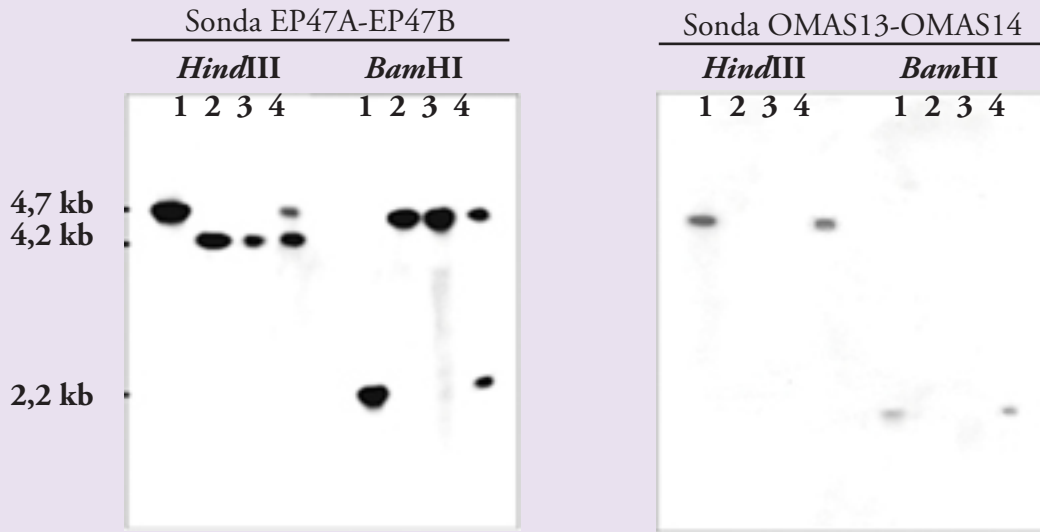


Figura 13.2

Análisis Southern de transformantes obtenidos con el plásmido pMAS25.

DNA del plásmido pMAS25 (carreras 1), y DNA genómico de la cepa B05.10 (carreras 2), del transformante GMAS 1 (carreras 3), y del transformante GMAS 7 (carreras 4), fueron digeridos con *Hind* III y con *Bam* HI, separados mediante electroforesis en gel de agarosa del 0'6 % (w/v), y transferido a una membrana de nylon. Los filtros fueron hibridizados sucesivamente con las sondas EP47A-EP47B, derivada de la región estructural del gen Bde47A, y OMAS13-OMAS14, derivada de la región codificante del gen codificador de la GFP. Ambas sondas son fragmentos de PCR amplificados con la combinación indicada de oligos.

era buscar un transformante en el que el alelo silvestre del gen Bde47A no hubiera resultado alterado y que incluyera una única copia, también íntegra, del alelo fusión. Se seleccionó el transformante GMAS7 que, en términos genéticos, resulta ser un diploide parcial para el gen Bde47A portador de dos alelos diferentes del mismo (funcionalmente heterocigoto): el alelo silvestre, detectado con la sonda derivada de la región codificante del gen Bde47A (Figura 13.3) y el alelo fusión, detectado con la sonda derivada de la región codificante del gen codificador de la GFP. El transformante

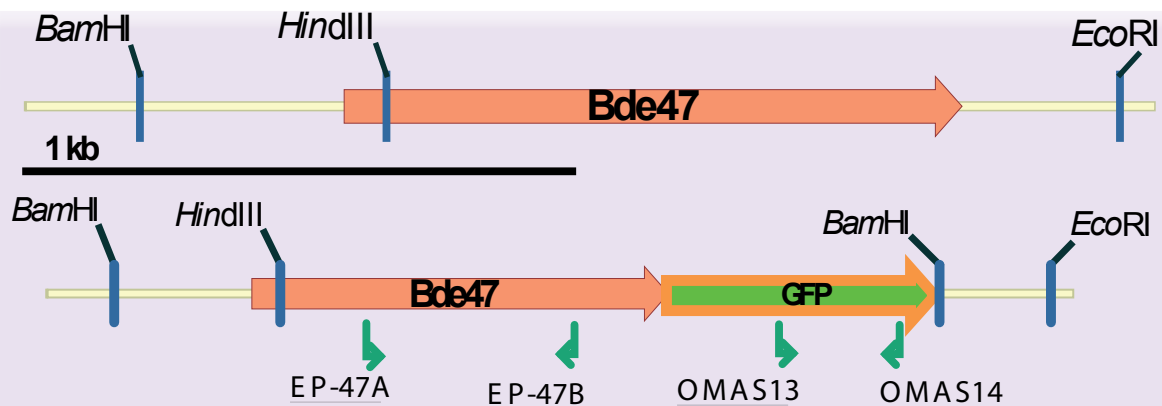


Figura 13.3

Mapa de restricción del alelo silvestre del gen Bde47A y del alelo fusión de este gen con el gen codificador de la GFP

GMAS1, según se deduce del análisis Southern, no ha adquirido el fragmento de ADN del plásmido pMAS25 correspondiente al alelo fusión pero es resistente a higromicina. Por lo tanto, parece que sólo ha integrado en su genoma la región del plásmido que incluye el casete de resistencia a higromicina.

Se comprobó entonces sobre el transformante GMAS7 que el alelo fusión se estaba expresando, lo que permitiría considerar que la proteína fusión también se estaba produciendo y que, por lo tanto, debería resultar factible detectar la fluorescencia característica de la GFP y obtener información sobre su localización subcelular. Para ello se cultivaron tanto la cepa silvestre B05.10 como el transformante GMAS7 en medio B5 en las condiciones habituales (sección 7.2.a de Materiales y Métodos) durante 5 horas y durante 16 horas. Se extrajo entonces RNA total de ambas cepas a ambos tiempos y se llevó a cabo un análisis de expresión génica, primero mediante RT-PCR y posteriormente mediante hibridación Northern.

Para la detección mediante RT-PCR se utilizaron muestras de cDNA de ambas estirpes derivadas de muestras de RNA de micelio cultivado durante 16 horas en las condiciones indicadas (Figura 13.4). Como controles se utilizaron DNA plasmídico del plásmido pMAS25 y DNA genómico del transformante GMAS7. Sobre cada muestra de cDNA o de DNA genómico molde se llevaron a cabo reacciones de PCR con dos combinaciones de cebadores. Las muestras utilizadas para el análisis de expresión mediante RT-PCR fueron cDNA de la cepa silvestre B05.10, cDNA del transformante GMAS7, ADN genómico del transformante GMAS7 y ADN del plásmido PMAS25 como molde en las amplificaciones por PCR para detectar la expresión del alelo fusión. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos por cada molde:

- EP47-A (5'-AGGTCACGGATCGGTCA-3') y OMAS14 (5'-TTTCGTTGGGATCTTTCG-3')
- OMAS13 (5'-TTCTTCAAGGACGACGGG-3') y OMAS14 (5'-TTTCGTTGGGATCTTTCG-3')

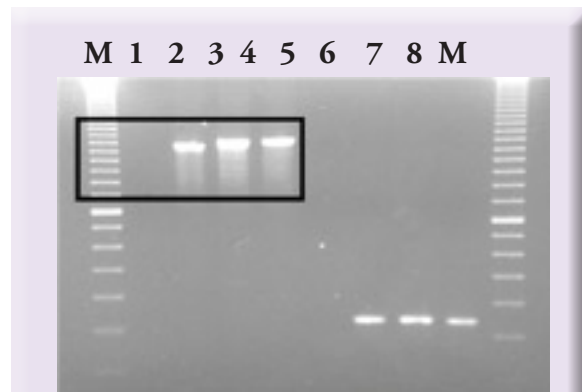


Figura 13.4

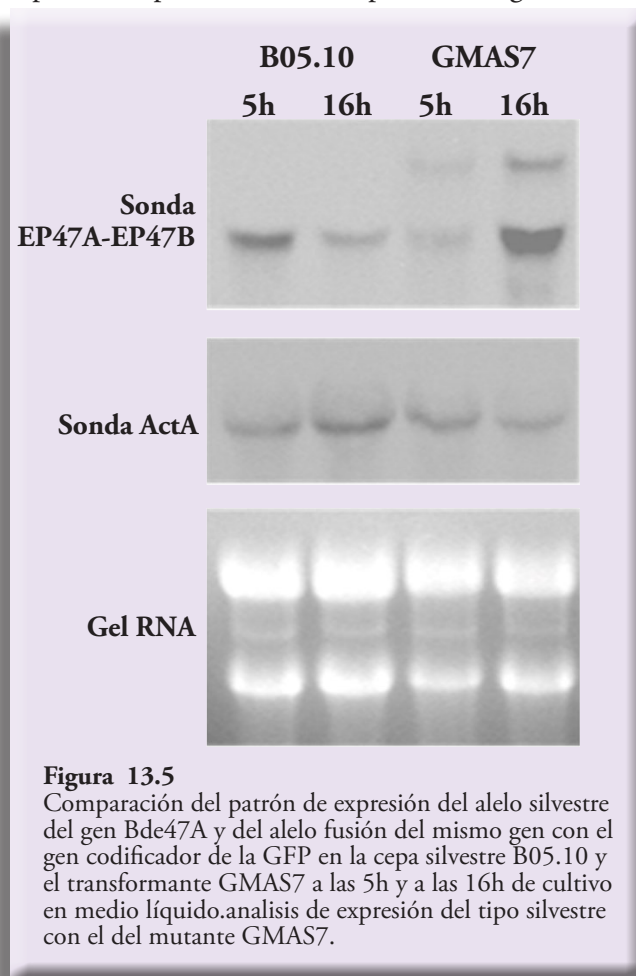
carril 1, 5: cDNA de la cepa silvestre B05.10 carril 2, 6: cDNA del transformante GMAS7 carril 3, 7: ADN genómico del transformante GMAS7 carril 4, 8: ADN del plásmido PMAS 25 En las reacciones 1, 2, 3 y 4 se utilizaron los pares de oligonucleótidos 47A y omas14, y en las reacciones 5, 6, 7 y 8 los oligonucleótidos omas13 y omas14. La diferencia en tamaños entre las bandas detectadas en los carriles 2 y carriles 3 y 4 se deben a la presencia del intrón en la región codificante del gen Bde47.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

El análisis de expresión mediante RT-PCR permitía comprobar que el alelo fusión se estaba expresando ya que se obtuvieron productos de amplificación de los tamaños esperados en las muestras de cDNA derivados del transformante GMAS7, pero en las muestras derivadas del tipo silvestre.

Para determinar que ambos alelos del gen Bde47A, tanto el alelo silvestre como el alelo fusión, se estaban expresando en el transformante GMAS7 decidimos llevar a cabo un análisis de expresión mediante hibridación northern. El análisis de expresión, que se puede observar en la Figura 13.5, indica que en la cepa silvestre la expresión del gen Bde47A es mayor durante la fase de germinación de las esporas que en estadios posteriores, concretamente a las 16 horas de incubación, cuando el micelio está creciendo vigorosamente y ramificándose de forma muy activa. Durante el crecimiento saprofito, por lo tanto, la expresión del gen no es constitutiva sino que parece estar regulada duran-



te el desarrollo. El estudio del comportamiento del transformante GMAS7 demuestra que ambos alelos del gen, el alelo silvestre y el alelo fusión, se están expresando en los dos momentos considerados. A las 5 horas los dos alelos se expresan a niveles similares, pero inferiores al nivel de expresión que muestra el alelo silvestre en el mismo momento en la cepa B05.10. El nivel de expresión de los dos alelos aumenta en fases posteriores, a las 16 horas, en particular la expresión del alelo silvestre. El patrón de expresión del alelo silvestre, por lo tanto, cambia en relación con el patrón observado en la cepa silvestre (en aquel caso disminuye con el tiempo y en este caso aumenta). Este cambio es consecuencia, únicamente, de la presencia simultánea del alelo fusión en el mismo fondo genético en el que está presente el alelo silvestre.

14.2 Análisis del transformante GMAS7

Una vez se hubo comprobado que el alelo fusión se está expresando en el transformante GMAS7, procedimos a tratar de determinar la localización subcelular del producto génico del alelo

fusión mediante la detección de la fluorescencia emitida por la GFP fusionada al extremo carboxilo de la proteína BCMIMP1. Como sospechábamos que la proteína era dirigida a la mitocondria, decidimos implementar el experimento con la utilización de una tinción específica para mitocondrias, MitoTracker Red.

Para facilitar el análisis de microscopía y la observación de las muestras biológicas consideramos como material idóneo para su estudio bien esporas recién germinadas, bien tubos germinativos en estadios de desarrollo iniciales. Cultivamos entonces *B. cinerea* en medio sales Gamborg's B5 suplementado con 10 mM sacarosa y 10 mM fosfato potásico pH 6.0 en las condiciones estándar de cultivo. Se inoculó un matraz de medio de cultivo con 5×10^5 esporas/ml, se incubó a temperatura ambiente y sin agitación durante 45 minutos y fue transferido posteriormente a un incubador en el que fue mantenido en agitación vigorosa (180 rpm) y a 22 °C hasta el momento de la toma de muestras. Transcurridas 3, 4 y 6 se tomaron alícuotas que fueron utilizadas para su observación al microscopio de fluorescencia previa tinción con MitoTracker siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. La Figura 13.6 muestra imágenes representativas tomadas sobre muestras representativas tomadas a las 3 horas (espora iniciando su germinación) (Serie A), a las 4 horas (espora emitiendo un tubo germinativo incipiente) (Serie B) y 6 horas (espora que ha generado dos tubos germinativos que se encuentra en fase de elongación activa) (Serie C).

En los tres casos se llevó a cabo en primer lugar una observación con luz visible (imágenes A.3 y C.3. La imagen correspondiente de la serie B no fue grabada de forma adecuada, razón por la cual no puede presentarse en la serie correspondiente). A continuación se llevó a cabo la detección de la fluorescencia roja emitida por el MitoTracker (imágenes A.1, B.1 y C.1) y en los tres casos pudo observarse un patrón de fluorescencia con apariencia de punteadura. Esta punteadura se distribuía de manera uniforme en el interior de la espora (imagen A.1) o de los tubos germinativos (imágenes B.1 y C.1) como pudo comprobarse al variar el plano de enfoque en las distintas muestras analizadas. Esta tinción permite identificar las mitocondrias. Se seleccionaron posteriormente la longitud de onda de excitación y de detección que permitirían detectar la fluorescencia que emitiría la GFP en el caso de que se estuviera expresando la fusión génica correspondiente en el transformante analizado. En estas condiciones también en los tres casos se detectó fluorescencia en verde (imágenes A.2, B.2 y C.2), indicando que, efectivamente, el alelo fusión estaba expresando. El patrón de fluorescencia en verde resultó ser absolutamente coincidente con el patrón de fluorescencia en rojo, como demuestra el análisis y observación de las imágenes A.4 y C.4 que resultan de la superposición de las imágenes correspondientes en cada una de las series para la observación en el visible, de fluorescencia roja y de fluorescencia verde. En el caso de la serie B no se llevó a cabo la superposición de imágenes, pero

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

puede observarse la coincidencia del patrón de fluorescencia en verde y del patrón de fluorescencia en rojo. Estas observaciones indican que GFP “colocaliza” con el MitoTracker y, por lo tanto, que

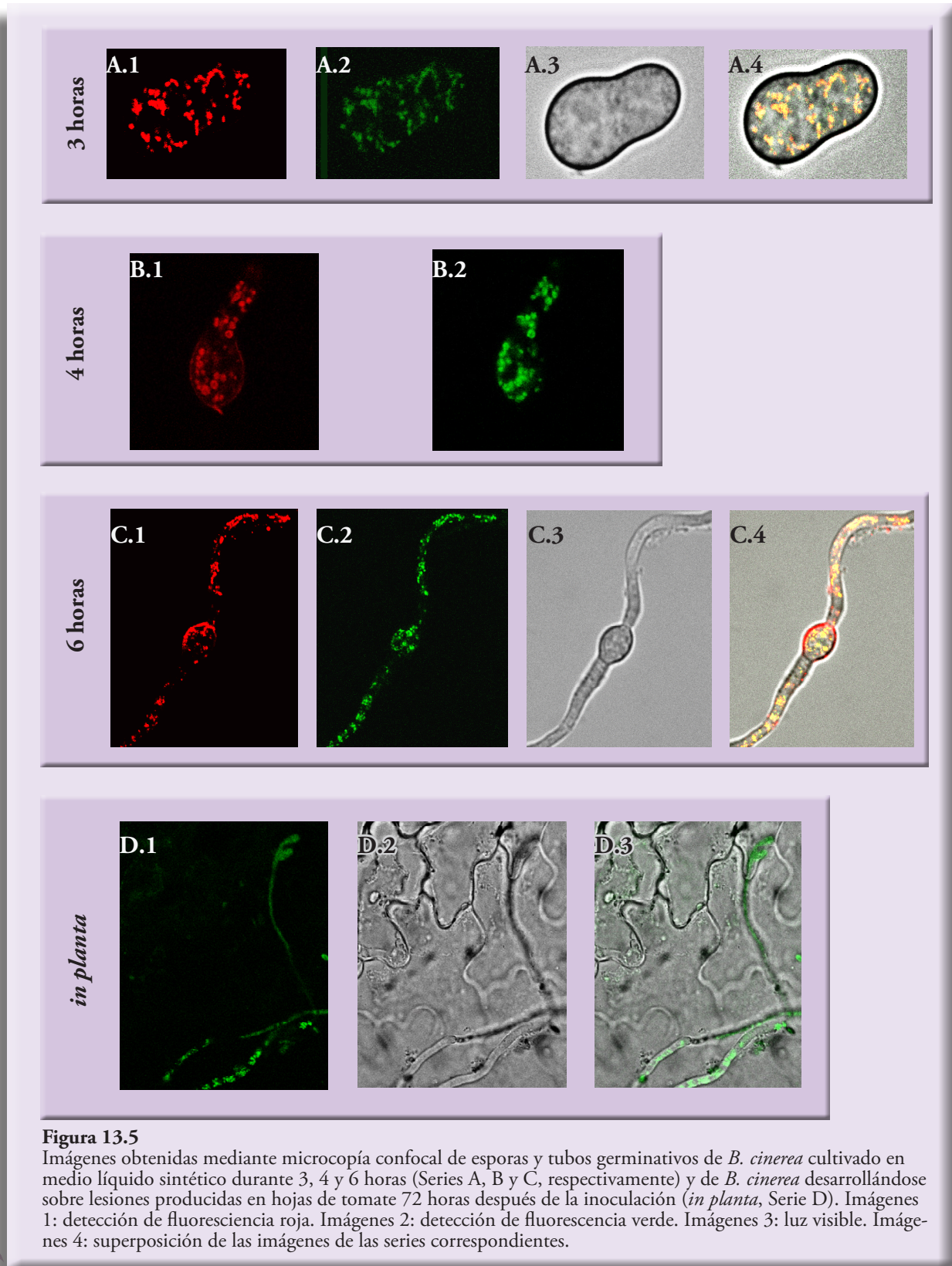


Figura 13.5

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de esporas y tubos germinativos de *B. cinerea* cultivado en medio líquido sintético durante 3, 4 y 6 horas (Series A, B y C, respectivamente) y de *B. cinerea* desarrollándose sobre lesiones producidas en hojas de tomate 72 horas después de la inoculación (*in planta*, Serie D). Imágenes 1: detección de fluorescencia roja. Imágenes 2: detección de fluorescencia verde. Imágenes 3: luz visible. Imágenes 4: superposición de las imágenes de las series correspondientes.

la proteína BCMIMP1, que proporciona las señales de localización subcelular a la proteína fusión, tiene, efectivamente, localización mitocondrial.

Teniendo en cuenta el análisis de expresión génica llevado a cabo previamente, la expresión del gen *Bcmimp1* es muy superior *in planta*, en particular durante las fases de penetración, de formación de lesiones dispersivas y de maceración del tejido infectado, en relación con el nivel de expresión durante el crecimiento saprofito. Para determinar si era posible o no detectar expresión de la proteína fusión *in planta* llevamos a cabo un experimento de inoculación sobre hojas de tomate y transcurridas 72 horas después de la inoculación (fase de formación de las lesiones dispersivas) se tomaron muestras de material infectado que consistían en tiras de tejido epidérmico infectado y sobre las mismas se llevó a cabo la detección de la fluorescencia en verde (en este caso no se realizó la tinción con MitoTracker). Como puede comprobarse en las imágenes de la serie D, fue posible detectar fluorescencia en verde en el micelio que se detecta en el tejido infectado, observación que confirma que la proteína se está expresando *in planta*, fluorescencia que adopta un patrón punteado similar al observado en esporas y en tubos germinativos cultivados en medios sintéticos (imágenes A.2, B.2 y C.2), patrón consistente, por lo tanto, con una localización mitocondrial de la proteína fusión.

14. Análisis funcional del gen *Bcmimp1*

El gen *Bcmimp1* fue identificado en el curso del análisis del patrón de expresión de *B. cinerea* durante su interacción con plantas de tomate en comparación con su patrón de expresión durante su crecimiento saprofítico. Este gen se expresa preferentemente durante las fases de penetración, formación de lesiones dispersivas y maceración del tejido infectado (Benito *et al.*, 1996). Para determinar si el gen *Bcmimp1* (y su producto génico) juega un papel relevante en el proceso de infección es necesario disponer de mutantes deficientes en el mismo y comparar la capacidad de infección de éstos sobre la planta huésped con la capacidad de la cepa silvestre.

En *B. cinerea* es posible obtener mutantes específicos alterados en un gen dado mediante estrategias de interrupción génica o de reemplazamiento génico una vez que se dispone del alelo silvestre del gen de interés. Aunque se ha descrito la transformación por replicación autónoma en este organismo, en la mayor parte de los casos el plásmido transformante se integra en el genoma de la estirpe receptora (Hamada *et al.*, 1994).

14.1. Obtención de mutantes deficientes en el gen *Bcmimp1*

Para obtener mutantes por interrupción génica es posible considerar dos estrategias diferentes. En primer lugar la integración simple en el locus homólogo de una copia modificada del alelo silvestre fruto de un único evento de recombinación. Como consecuencia de esta integración simple resulta alterada, pero no eliminada, la copia residente del gen de interés. En segundo lugar, el reemplazamiento génico del alelo silvestre por una copia no funcional del mismo, reemplazamiento génico derivado de dos eventos de recombinación que deben tener lugar en las regiones flanqueantes del gen de interés. La frecuencia con la que tiene lugar la integración en el locus homólogo en *B. cinerea* ha permitido obtener mutantes por disrupción génica (van Kan *et al.*, 1997) y por reemplazamiento génico (ten Have *et al.*, 1998)

En el presente trabajo, y teniendo en cuenta que el segundo procedimiento garantiza la eliminación del alelo silvestre residente, decidimos llevar a cabo una estrategia de obtención de mutantes deficientes en el gen *Bcmimp1* mediante reemplazamiento génico.

14.1.a. Construcción del plásmido p47-13 y transformación de *B. cinerea*.

Para la obtención de mutantes por reemplazamiento génico se construyó el plásmido p47-13. Este plásmido porta como marcador seleccionable el gen bacteriano *hph*, codificador de la enzima hi-

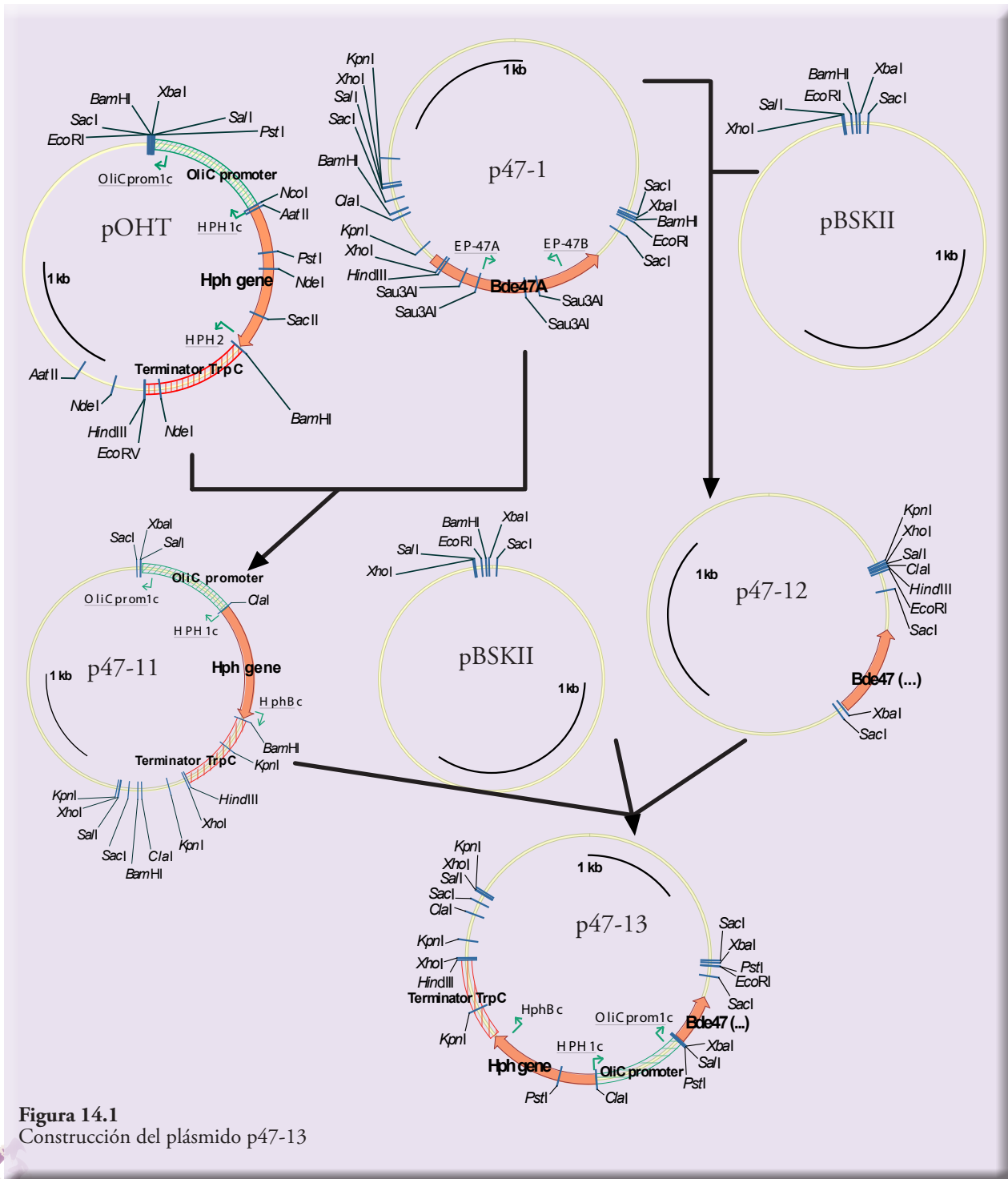
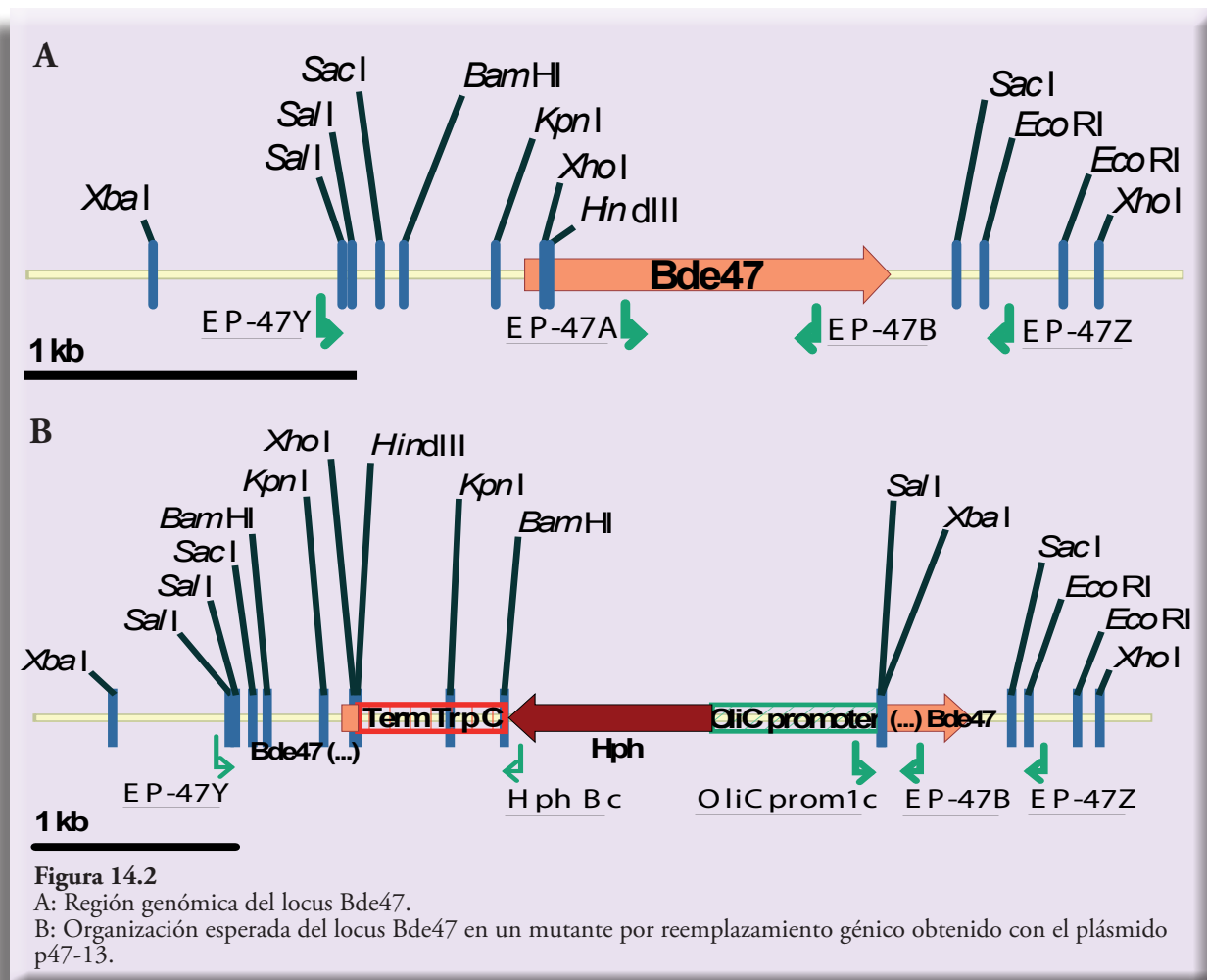


Figura 14.1
Construcción del plásmido p47-13

gromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Para su expresión eficiente en *B. cinerea* el gen *hph* ha sido fusionado al promotor del gen *oliC* de *Aspergillus nidulans* y al terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* (Ward 1991). La fusión resultante, clonada en pUC18, fue cedida amablemente por el Dr. M. Ward (Genecord International, South San Francisco, Calif.).

Para la construcción del plásmido utilizado en la transformación se digirió el plásmido p47-1 con las enzimas de restricción *Hind*III y *Xba*I para quedarnos con la región de 1.538 nucleótidos del plásmido p47-1 que contiene la región 5' de Bde47 y el vector de clonación, a la que se le insertó la fusión génica que permite expresar la resistencia a higromicina en *B. cinerea*, presente en el plásmido pOHT, y obtener el plásmido p47-11. Paralelamente se digirió p47-1 con las enzimas *Sau*3A y *Eco*RI y se purificó el fragmento de 722 nucleótidos que contiene la parte final del gen Bde47 y su región 3'. Este fragmento fue clonado en el vector pBluescriptSK para obtener de este modo el plásmido p47-12.

A continuación se digirió el plásmido p47-11 con las enzimas de restricción *Sal*I y *Xba*I y se purificó el fragmento que *Sal*I-*Xba*I de 3,2 kb que contiene el promotor y el casete de resistencia a



Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

higromicina. El plásmido p47-12 se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* para obtener el fragmento *EcoRI-XbaI* de 734 nucleótidos que contiene la región terminadora del gen *Bde47*. Ambos fragmentos fueron clonados en una ligación de tres fragmentos en el plásmido pBluescript SK digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRI* dando lugar al plásmido p47-13. El mapa de restricción de la copia genómica del gen *Bde47A* y de sus regiones flanqueantes se muestra en la figura 14.1.

Una vez construido el plásmido necesario para el reemplazamiento génico se llevaron a cabo en paralelo una transformación de protoplastos de la cepa silvestre B05.10 de *B. cinerea* con el plásmido p47-13 y una transformación control sin añadir DNA, siguiendo los procedimientos experimentales descritos en el apartado 11.6.c de la sección Materiales y Métodos. Para obtener un número elevado de transformantes se realizaron un total de tres experimentos de transformación.

Trascurridas 48 horas desde la siembra de la mezcla de transformación en placas de medio selectivo los transformantes, fácilmente visibles emergiendo de la cobertera, fueron rescatados y transferidos individualmente a placas frescas de medio MEA suplementado con 100 µg/ml de higromicina para confirmar su naturaleza transformante.

Algunos transformantes resultaron ser falsos positivos, ya que resultaron incapaces de desarrollarse en el medio selectivo, siendo desechados. Finalmente se seleccionaron un total de 43 transformantes para su posterior purificación y análisis.

14.1.b. Análisis de los transformantes e identificación de candidatos

Debido a la naturaleza multinucleada de los protoplastos de *B. cinerea* los transformantes seleccionados directamente en las placas de transformación contienen generalmente una mezcla de núcleos transformados y no transformados. Por lo tanto, es probable que el micelio de estos transformantes sea micelio heterocarionte, portador de núcleos transformados y de núcleos no transformados.

Para enriquecer el micelio de los transformantes en núcleos transformados se realizaron réplicas sucesivas (5-7) de cada uno a placas frescas de medio selectivo, transfiriendo en cada réplica un bloque de agar derivado del borde de crecimiento de cada colonia (tal y como hemos descrito en el apartado 8 de la sección Materiales y Métodos). Finalmente, se extrajo DNA a partir del micelio aéreo desarrollado en placa para su análisis y selección.

Para identificar aquellos transformantes en los que pudiese haber tenido lugar un proceso de doble recombinación homóloga causante de un reemplazamiento génico del gen *Bcmimp1* y que, en la medida de lo posible, no presenten núcleos portadores del alelo silvestre del gen *Bcmimp1*, se diseñó una estrategia rápida de análisis de los transformantes basada en la reacción en cadena de la

polimerasa. De esta manera se procedió a una selección de candidatos mediante PCR.

Con este objeto se extrajo DNA genómico de cada cepa transformante purificada haciendo uso de un método de extracción rápida de ADN genómico a partir de micelio aéreo recogido directamente de la superficie de la placa de cultivo (Materiales y Métodos 11.1.a.2). A continuación se trató de amplificar mediante PCR dos fragmentos de ADN, uno de ellos correspondiente a la región flanqueante en el extremo 5' del gen *Bcmimp1* y el otro correspondiente a la región flanqueante 3',

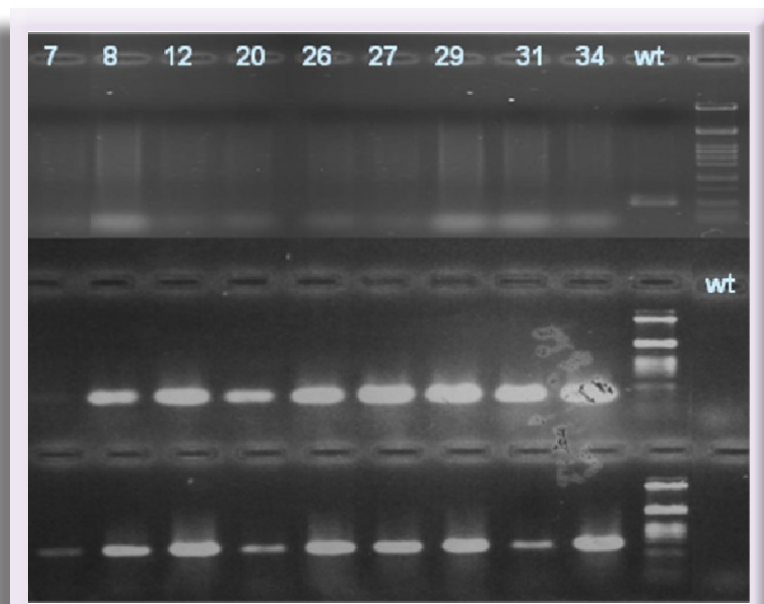


Figura 14.3
Análisis mediante PCR de algunos transformantes obtenidos con el plásmido p47-13.

utilizando en cada caso una combinación de oligonucleótidos que permitiría amplificar el fragmento diana en cada caso únicamente si se hubiera producido recombinación homóloga entre el alelo silvestre del gen *Bcmimp1* y la copia mutante del mismo, bien en el fragmento de DNA derivado de la región 5', bien en el fragmento derivado de la región 3', ambos clonados en el plásmido 47-13 a uno y otro lado del cassette de resistencia a higromicina. Para ello se diseñaron 2 parejas de oligonucleótidos (ver Figura 14.2):

- **EP-47Y** (5'-TTCATTGGTGCGCAGCGATC-3'), cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de la secuencia aguas abajo del gen *Bcmimp1* entre las posiciones +1498 y +1518, localizada más allá de la secuencia clonada en el plásmido 47-13 y **hphBc** (5'-CGTCTGGACCGATGGC TGTG-3'), cuya secuencia coincide con la secuencia de la cadena codificante del gen *hph*). Esta pareja de oligonucleótidos permiten amplificar un fragmento de 1,65 kb cuando ha ocurrido algún evento de sobrecruzamiento en la región 5' del gen.
- **EP-47Z** (5'-TCAGTCTTGAAGTGCAGGTG-3'), cuya secuencia coincide con la secuencia aguas arriba del gen *Bcmimp1* entre las posiciones -629 y -609, localizada fuera de la región clonada incluida en el plásmido 47-13 y **OliCprom1c** (5'-CCACTTAGTGGCACGT CGCG-3'), cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de la secuen-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

cia de la cadena codificante del promotor OliC del cassette de resistencia a higromicina. Esta pareja de oligonucleótidos permiten amplificar un fragmento de 0,84 kb cuando ha ocurrido algún evento de sobrecruzamiento en la zona 3' del gen.

Para comprobar la presencia o no del alelo silvestre el gen Bde47A se llevó a cabo, además, en todos los casos (transformantes) una reacción de PCR con los oligonucleótidos EP-47A y EP-47B (ver Figura 14.1A):

- **EP-47A (5'-AGGTCACGGATCGGTCA-3')**, cuya secuencia coincide con la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del gen Bde47 entre las posiciones +312 y +328 y **EP-47B (5'-TTCTTCCTCTACCGACC-3')**, cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de la secuencia de la cadena codificante del gen Bde47 entre las posiciones +919 y +903.

Estos oligonucleótidos permiten amplificar un fragmento de 0,6 kb de la secuencia codificante del gen *Bcmimp1*. En reacciones de PCR en las que se utiliza como molde DNA de cada transformante, la amplificación o no amplificación de este fragmento permite distinguir aquellos transformantes en los que la copia residente del gen *Bcmimp1* no ha sido eliminada de aquellos transformantes en los que sí ha sido eliminada.

En los 43 transformantes elegidos inicialmente se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico de cada transformante e incluyendo en cada reacción una de las tres parejas de oligonucleótidos indicadas. La Figura 14.3 muestra algunos resultados representativos derivados del análisis de nueve transformantes diferentes. La banda de 608 pares de bases derivada del gen *Bcmimp1* (EP47-A + EP47-B) fue amplificada en la mayoría de las reacciones, pero no se detectó en absoluto o muy levemente en las reacciones correspondientes a los transformantes 7, 8, 12, 15, 17, 20, 23, 26, 27, 29, 31 y 34. Estos resultados indican que en estos últimos transformantes ha tenido lugar, probablemente, la eliminación de la copia residente del gen Bde47. Estos nueve transformantes fueron seleccionados para una caracterización detallada. Como control se utilizó el regenerante C4, un regenerante al que no se le introdujo ningún material genético extra, pero que sí pasó por el mismo proceso de transformación que los transformantes.

Para garantizar que las estirpes mutantes obtenidas fueran cepas genéticamente homogéneas se purificaron cultivos monospóricos de cada transformante seleccionado. Para ello, en cada caso se sembraron 100 esporas en placas petri con medio MEA. Transcurridas 24 horas se transfirieron

de forma individualizada, con ayuda de una aguja enmangada y en la lupa, esporas ya germinadas a placas de medio MEA suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina. De cada transformante se conservaron individualmente tres cultivos diferentes derivados cada uno de ellos de una espora única. Estos transformantes se volvieron a purificar de nuevo como cultivo monospórico. Para posteriores análisis se seleccionó un cultivo monospórico de cada transformante.

Para confirmar que los transformantes seleccionados mediante el análisis por PCR son en realidad transformantes en los que se ha eliminado la copia residente del gen *Bcmimp1*, se llevó a cabo un análisis de los mismos mediante hibridación Southern.

Cada transformante fue cultivado en placas petri con medio PDA-tomate, de las cuales se recogieron esporas con las que se inocularon en 100 mL de medio Malt Extract al 1%, a una concentración de 10^6 esporas/mL. Estos cultivos se incubaron a 22 °C y 180 rpm durante 16 horas y transcurrido este tiempo el micelio fue recogido por filtración y utilizado para la obtención de DNA genómico de alto peso molecular siguiendo el método descrito en el apartado 11.1.a.1. de la sección

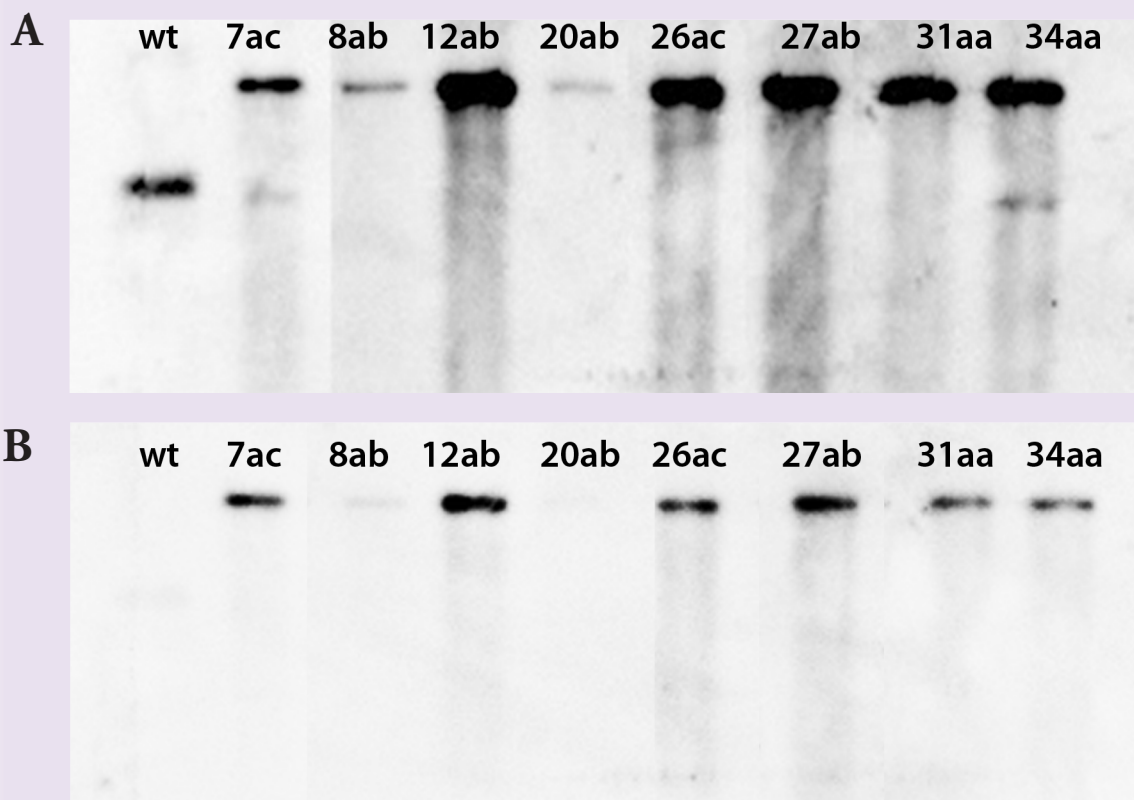


Figura 14.4

A: Hibridación a 65 °C de ADN genómico de los transformantes 47-13 elegidos con la sonda 2 (fragm RV-2, 6kb)

B: Hibridación a 65 °C de ADN genómico de los transformantes 47-13 elegidos con la sonda HYG

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Materiales y Métodos. Los DNA genómicos de la estirpe silvestre B05.10 y de cada uno de los transformantes seleccionados fueron digeridos con la enzima de restricción *Hind*III, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidos a un filtro de nylon. Este filtro fue hibridado sucesivamente, y siempre en condiciones restrictivas (65 °C), con dos sondas distintas:

- **Sonda 2 (fragm RV - 2,6 kb).** Derivada de un fragmento de 2,6 kb proveniente de la región 3' del terminador comprendido entre los sitios de restricción *Eco*RI y *Eco*RV y marcado por Random Priming. Ver Figura 14.5.A.
- **Sonda HYG.** Derivada de la secuencia codificante del gen que confiere resistencia al antibiótico higromicina amplificada y marcada también por PCR utilizando como molde ADN del plásmido pOHT y en presencia de los oligonucleótidos **HphA** e **HphB**. Ver Figura 14.5.B.

Los resultados obtenidos en las dos hibridaciones llevadas a cabo con las dos sondas indicadas, 47AB y HYG se muestran en la figura 14.4.B.

En la hibridación con la Sonda 47AB se detectó una única banda de hibridación de 4,2 kb en el carril correspondiente a la estirpe receptora no transformada (TB05.10), banda que representa el alelo silvestre del gen *Bcmimp1*. Esta banda está ausente en la mayor parte de los transformantes obtenidos con el plásmido p47-13 que fueron analizados, como cabe esperar en aquellos transformantes en los que el alelo silvestre del gen *Bcmimp1* haya sido reemplazado por el alelo mutante presente en el plásmido p47-13. Sólo en el caso de los transformantes 7ac y 34aa se detecta una banda tenue de 4,2 kb, indicando que en este transformante el alelo silvestre puede permanecer inalterado, al menos en algunos núcleos. En el resto de transformantes obtenidos con el plásmido p47-13 no se detecta la banda de 4,2 kb y sí se detecta una banda de 6,275 kb, que es el tamaño esperado si ha tenido lugar el reemplazamiento génico de la copia silvestre del gen Bde47 por el alelo mutante clonado en el plásmido p47-13.

La hibridación con la sonda HYG demostró que todos los transformantes son portadores de la fusión génica que permite expresar el gen de resistencia a higromicina en hongos filamentosos. En cada transformante se detectó una única banda de hibridación de 6,275 kb, que representa el alelo mutante correspondiente de los transformantes obtenidos con el plásmido p47-13.

El análisis mediante hibridación Southern demostró que todos los transformantes analizados son transformantes en los que ha tenido lugar el reemplazamiento génico del alelo silvestre del gen *Bcmimp1* por una forma mutante del mismo. En algunos casos, como por ejemplo en los transfor-

mantes 7ac y 34aa, el alelo silvestre está aún presente (aunque no fue detectado por PCR), si bien en una proporción muy reducida de los núcleos como puede deducirse de la comparación de las intensidades de las bandas que representan el alelo silvestre y el alelo mutante en ambos casos en el análisis Southern. En los demás transformantes seleccionados como candidatos mediante PCR, podemos concluir a la luz de los resultados del análisis Southern que el alelo mutante se encuentra en homocariosis y que no existen copias adicionales del plásmido transformante integradas en otras regiones del genoma de la estirpe receptora. Estas estirpes mutantes deficientes en el gen *Bcmimp1* pueden ser utilizadas para llevar a cabo un análisis funcional del mismo.

14.2 Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta Bcmimp1$

Una vez que se dispone de mutantes alterados específicamente en el gen *Bcmimp1*, la caracterización de los mismos en comparación con la estirpe silvestre puede proporcionar información sobre la función biológica de este gen. Dos aspectos diferentes fueron estudiados en detalle:

1. el comportamiento de los mutantes durante el crecimiento saprofítico.
2. el comportamiento de los mutantes durante su interacción con la planta huésped.

14.2.a. Análisis de comportamiento durante el crecimiento saprofítico

Para realizar todos los análisis que se describen a continuación se seleccionaron cuatro transformantes diferentes obtenidos con el plásmido p47-13: los transformantes T12ab, T26ac, T27ab y T31aa. Como control se utilizó la cepa C4, derivada de protoplastos individuales que han sido sometidos a

	12ab	26ac	27ab	31aa	C4
MEA (72 hpi)	3,18 ± 0,130	3,36 ± 0,126	3,34 ± 0,153	3,35 ± 0,069	3,59 ± 0,158
B5GS (72 hpi)	3,83 ± 0,077	3,90 ± 0,136	3,59 ± 0,124	3,87 ± 0,039	3,60 ± 0,073
MEA (96 hpi)	5,62 ± 0,160	5,98 ± 0,124	6,03 ± 0,241	5,96 ± 0,222	6,26 ± 0,226
B5GS (96 hpi)	6,00 ± 0,144	6,28 ± 0,212	5,83 ± 0,253	6,15 ± 0,030	5,79 ± 0,088

Tabla 14.I
Medias de los diámetros de los distintos aislados analizados junto a su desviación estandar.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

los mismos procedimientos y tratamientos experimentales que las cepas mutantes.

Para determinar si la eliminación del gen *Bcmimp1* determinaba algún tipo de alteración en la capacidad de crecimiento saprofítico de *B. cinerea* se decidió analizar el comportamiento de las cepas mutantes durante su cultivo en medio sólido en relación con la cepa silvestre. Para ello se estudio y evaluó la capacidad de crecimiento saprofítico en medio sólido estimando el diámetro de la colonia.

El crecimiento radial en medio sólido de las cepas silvestre, T12ab, T26ac, T27ab y T31aa fue analizada en dos tipos de medio, un medio más rico (MEA) y un medio más pobre (medio B5). La capacidad de crecimiento saprofítico de las cepas se analizó estimando el diámetro lineal de la colonia derivada del crecimiento de 500 conidios depositados en una gota de 5 μ l de volumen en el centro de una placa de Petri, incubadas a 22 °C, a los 3 y 4 días desde el inicio de la inoculación. Para cada

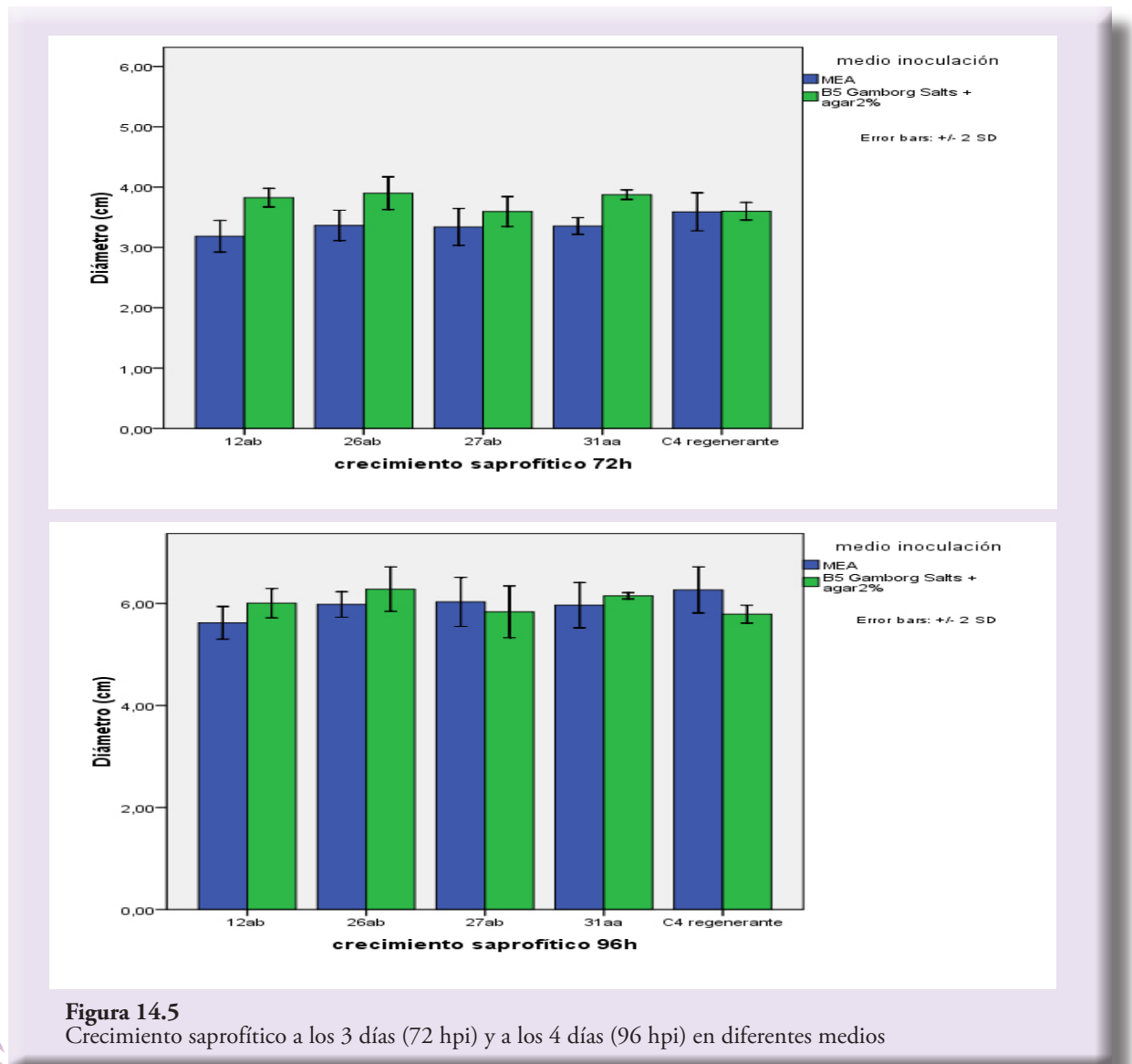


Figura 14.5

Crecimiento saprofítico a los 3 días (72 hpi) y a los 4 días (96 hpi) en diferentes medios

cepa y condición se sembraron 5 placas. Los resultados se pueden ver en la Figura 14.5, que muestra las gráficas obtenidas al representar el diámetro de la colonia en crecimiento en cada momento para cada una de las cepas analizadas. Cada gráfica representa los valores obtenidos a distintos tiempos, 3 días y 4 días. Los valores de las estirpes control y de las estirpes mutantes fueron muy similares entre sí en cada tipo de medio, no detectándose diferencias significativas entre los radios de las colonias en crecimiento en ningún caso en ninguno de los puntos temporales considerados. La tabla 14.I muestra los valores de las medias y la desviación estandar de las distintas cepas analizadas. El análisis estadístico mediante el modelo lineal general (ANOVA), no mostraba diferencias significativas ($p > 0,05$) en el crecimiento saprofítico entre los mutantes y los controles en los dos medios de cultivo utilizados.

14.2.b. Análisis de comportamiento “in planta” (virulencia)

Las cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ no muestran diferencias en su capacidad de crecimiento saprofítico en relación con las cepas utilizadas como control, como demuestran los resultados descritos en la sección 14.2.a. De esta manera, si las cepas mutantes manifestaran alguna diferencia con las cepas control en relación con su capacidad para infectar a la planta huésped, las diferencias podrían ser adscritas a una alteración en características fisiológicas implicadas directamente en patogenicidad. El gen alterado en los mutantes correspondientes podría ser considerado, con todo sentido, un factor de patogenicidad. Para realizar todos los análisis que se describen a continuación se eligieron las mismas cuatro cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ (T12ab, T26ac, T27ab y 31aa) y la misma cepa control (C4) estudiada en relación con la capacidad de crecimiento saprofítico.

Para comparar el comportamiento *in planta* de los mutantes en relación con la cepa silvestre, es necesario disponer de un sistema de inoculación artificial sobre un huésped dado que proporcione resultados reproducibles. En nuestro caso el sistema *B. cinerea* - tomate ha sido convenientemente caracterizado (Benito *et al.*, 1998) disponiendo de un sistema de inoculación que proporciona altas eficiencias de infección y resultados reproducibles. Para analizar la agresividad de las cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ elegidas y de la cepa control se realizaron una serie de ensayos de infección sobre hojas de tomate y judía. Además, el gen *Bcmimp1* fue aislado utilizando como criterio su expresión diferencial durante la interacción de *B. cinerea* sobre tomate. El sistema de inoculación en condiciones controladas que manejamos en el laboratorio utiliza hojas de tomate y permite generar resultados altamente reproducibles. Además, la información que se obtiene sobre tomate resulta orientativa sobre el comportamiento general de *B. cinerea* sobre otros huéspedes para los que el sistema de ino-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

culación no produce resultados tan claros. Por estas dos razones se decidió utilizar como huésped en los experimentos de inoculación plantas de tomate de la variedad Roma con seis semanas de edad y hojas cotiledonares de judía de dos semanas de edad.

14.2.b.1 Inoculaciones.

Para inducir eficiencias de infección elevadas de *B. cinerea* en sistemas de inoculación artificiales es necesario aplicar el inóculo en una solución que contenga azúcar y fosfato (comúnmente suministrados como sacarosa y KH_2PO_4) (Harper *et al.*, 1981; van den Heuvel, 1981). Para ello se utilizan dos medios de inoculación: inóculo preparado en medio B5 enriquecido con azúcar y fosfato (B5GS) ó inóculo de PDB a la mitad de su concentración habitual (PDB $\frac{1}{2}$) (ver sección 9.2 de Materiales y Métodos).

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

Teniendo en cuenta estas consideraciones se realizaron diversos experimentos de inoculación siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 9.2 de la sección de Materiales y Métodos. Las esporas recién recogidas de las placas de cultivo tanto de la estirpe control como de los cuatro transformantes analizados se diluyeron en medio PDB $\frac{1}{2}$ o en medio B5GS enriquecido, a una concentración final de 10^5 esporas/ml. A continuación se aplicaron sobre los folíolos de una hoja de tomate 5 gotitas de 5 μl de volumen de la suspensión de esporas. Siempre se inoculó con la cepa control en todas las hojas. El progreso de la infección fue seguido desde el momento de la inoculación hasta que habían transcurrido 72 horas desde la inoculación.

Los primeros síntomas de la infección producida por la estirpe silvestre en estas condiciones experimentales se aprecian a 24 hpi. Se trata de pequeñas manchas necróticas de color marrón oscuro del tamaño de la gotita de inoculación. Desde este momento las lesiones van aumentando de tamaño, al principio más lentamente y más tarde más rápidamente. Transcurridas 72 horas desde la inoculación, las lesiones necróticas se convierten en lesiones dispersivas y desde ellas el hongo es capaz de invadir y colonizar el folíolo completo en 24-48 horas más.

14.2.b.2. Análisis de la capacidad de penetración

Prácticamente el 100% de las gotitas de inoculación depositadas sobre hojas de tomate y judía generaron lesiones dispersivas a las 72 hpi cuando se utilizó el medio PDB $\frac{1}{2}$ para preparar las suspensiones de inoculación. Las inoculaciones llevadas a cabo con B5GS presentaron una variabilidad entre experimentos muy importante en cada uno de los dos huéspedes (los resultados en este medio mínimo son menos reproducibles). Por esta razón, se decidió considerar como sistema válido de análisis el basado en los datos derivados de las inoculaciones en medio PDB $\frac{1}{2}$.

Como se comprueba en la tabla 14.II, tanto las cepas control como de las cepas mutantes

	Tomate (PDB $\frac{1}{2}$)	Judía (PDB $\frac{1}{2}$)
T12ab	100 %	100 %
T26ac	100 %	100 %
T27ab	100 %	100 %
T31aa	100 %	100 %
C4	100 %	99,4 %

Tabla 14.II

Porcentaje de lesiones dispersivas de los mutantes seleccionados y de la cepa control sobre tomate y judía.

mostraron la misma eficiencia de penetración que la cepa control con el medio PDB $\frac{1}{2}$ como medio de inoculación. Esto nos ayudó a optimizar el sistema usando PDB $\frac{1}{2}$ como medio de inoculación en experimentos sucesivos.

14.2.b.3. Análisis de la agresividad sobre la planta huésped

	Tomate (PDB $\frac{1}{2}$)		Judía (PDB $\frac{1}{2}$)	
	N	Media \pm Desv. Std.	N	Media \pm Desv. Std.
12ab	87	9,59 \pm 2,6 mm.	39	11,47 \pm 4,7 mm.
26ac	92	10,03 \pm 2,8 mm.	35	11,19 \pm 3,3 mm.
27ab	67	10,58 \pm 2,6 mm.	24	10,37 \pm 3,3 mm.
31aa	49	10,66 \pm 2,2 mm.	15	11,72 \pm 3,6 mm.
C4	90	8,86 \pm 2,6 mm.	36	9,09 \pm 4,3 mm.

Tabla 14.III

Análisis de agresividad de las cepas mutantes y de la cepa de referencia mediante la estimación del diámetro medio de lesión. Descripción de la muestra y del valor medido (media) con su desviación típica.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Se valoró entonces el diámetro de todas las lesiones dispersivas producidas a las 72 hpi sobre los dos huéspedes analizados. Sobre cada huésped se llevaron a cabo cuatro experimentos de inoculación independientes. Los datos obtenidos en los cuatro experimentos de inoculación fueron tratados con-

	Tomate (PDB ½)	
	DMS	Tukey HSD
C4 vs. 12ab	0,065	0,344
C4 vs. 26ac	0,003	0,023
C4 vs. 27ab	0,000	0,001
C4 vs. 31aa	0,000	0,001
	Judía (PBD ½)	
	DMS	Tukey HSD
C4 vs. 12ab	0,023	0,150
C4 vs. 26ac	0,054	0,300
C4 vs. 27ab	0,332	0,867
C4 vs. 31aa	0,054	0,299

Tabla 14.IV
Valores obtenidos para p, en diferentes test post-hoc, al enfrentar la cepa control (C4) con las cepas mutantes.

juntamente para estimar el diámetro medio de lesión de cada cepa estudiada: la cepa control C4 y las cepas mutantes 12ab, 26ac, 27ab y 31 aa. La tabla 14.III presenta los valores obtenidos de estos experimentos de inoculación sobre tomate y judía que hacen posible la comparación de la capacidad de infección de las cepas mutantes y de la cepa control.

La inspección visual de las lesiones producidas por las distintas cepas analizadas permitió comprobar que en todos los casos, cepa control y cepas mutantes, el aspecto de las lesiones era muy similar en todas ellas en ambos huéspedes, si bien el progreso de la infección parecía ser ligeramente más rápido en algunos mutantes. Por esta razón, se procedió a llevar a cabo un análisis estadístico mediante un Análisis de Varianza para el factor cepa. Sobre tomate, este análisis demuestra que el factor cepa ejerce un efecto significativo sobre la variable “diámetro medio de lesión dispersiva” ($p < 0,001$). Decidimos entonces comparar las diferencias significativas entre medias aplicando dos pruebas estadísticas post-hoc: DMS (Diferencia Mínima Significativa basada en la distribución t de Student) y Tukey HSD (Diferencia Honestamente Significativa de Tukey). Ambas pruebas permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas de la cepa control en relación con tres de las cepas mutantes, 26ac, 27ab y 31 aa, como muestra la Tabla 14.IV. En el caso de la cepa 12ab, aún siendo el diámetro medio mayor que en la cepa control, las diferencias no resultaron significativas en comparación con la cepa control ($p > 0,05$) con ninguna de las dos pruebas, aunque el valor fue muy próximo con el test DMS ($p = 0,065$). Sobre judía las medias de diámetro de lesión también son

mayores para las cepas mutantes en comparación con la cepa control, pero el análisis de la varianza no detecta diferencias significativas ($p=0,130$).

El test de Tukey HSD en tomate estableció la existencia de dos grupos entre las cinco cepas analizadas, como se puede observar en la Tabla 14.V. Uno de los grupos incluía a todos los mutantes, mientras que el otro grupo englobaba a la

cepa control C4 y a los mutantes 12ab y 26ac. Es decir, existe una cierta ambigüedad en cuanto a la asignación de las cepas 12ab y 26ac a un grupo u otro, pero ciertamente el análisis estadístico tiende a agrupar con claridad las cepas mutantes entre sí.

Estos resultados indican que la eliminación del gen *Bcmimp1* determina un cambio apreciable en la capacidad de *B. cinerea* para infectar al tomate, indicando que su producto génico puede jugar un papel relevante en el proceso de infección al menos en este huésped.

	TUKEY HSD (tomate)	
	1	2
C4	8,863	
12ac	9,59	9,59
26ab	10,025	10,025
27ab		10,582
31aa		10,657

Tabla 14.V

Análisis mediante el método Tukey HSD de las diferencias entre los diámetros de las lesiones dispersivas sobre hojas de tomate producidas por las distintas cepas.

15. Estrategias para la identificación del gen Bde47B

Teniendo en cuenta las observaciones y los resultados derivados de los experimentos de hibridación Southern llevados a cabo sobre muestras de DNA genómico de *B. cinerea* digerido con distintas enzimas de restricción y probadas con la sonda ddB47 pudimos concluir que en el genoma de *B. cinerea* existen distintas secuencias (ubicadas en diferentes regiones del genoma) que presentan una homología significativa con el fragmento ddB47. Una de estas secuencias es el gen Bde47A que codifica el mensajero de aproximadamente 1,4 kb detectado mediante hibridación northern. Pero existen otras, y una debe corresponder al gen que codifica el segundo mensajero detectado en la hibridación northern, aquel que muestra un tamaño aproximado a 1 kb. Para abordar el aislamiento del gen codificador de este segundo mensajero nos propusimos seguir dos aproximaciones experimentales, ambas basadas en criterios de homología de secuencia. Aunque el gen Bde47A ha sido renombrado como consecuencia de nuestro análisis como *Bcmimp1*, consideramos que para la descripción del trabajo que presentamos a continuación resulta más claro referirnos a este gen como Bde47A a lo largo de esta sección.

En primer lugar se aplicó una estrategia basada en procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, como en el caso del gen Bde47A. Se escrutó la misma genoteca de DNA genómico de *B. cinerea* (cepa SAS56) construida en el vector lambda EMBL3 (van der VlugtBergmans et al., 1997b), utilizando en este caso condiciones de hibridación moderadamente restrictivas y utilizando como sonda, también en este caso, el fragmento de cDNA ddB47, como se ha descrito en la sección 12.3. De esta manera se detectaron varios fagos que mostraban señales de hibridación menos intensas que la que presentan los fagos correspondientes para el gen Bde47A (Figura 12.4). Se seleccionaron varios halos de lisis que fueron numerados con los códigos B1 a B15 y picados de la placa original.

En segundo lugar y en paralelo, se procedió a la búsqueda de secuencias similares, pero no idénticas, a la secuencia del fragmento “ddB47”. Esto último se pudo realizar gracias a la liberalización pública del genoma de *B. cinerea* por parte de Singenta.

15.1. Hibridación en condiciones moderadamente restrictivas.

Se extrajo DNA a partir de los 15 halos de lisis seleccionados detectados en condiciones de baja as-tringencia. A continuación se purificó el DNA de los fagos seleccionados y se procedió a la digestión con las enzimas *SalI* y *SalI-EcoRI* en reacciones diferentes, para realizar el análisis de restricción. Este análisis nos permitió detectar la presencia de varios fagos con el mismo patrón de restricción, tratán-dose entonces de fagos que habían incorporado el mismo fragmento de DNA y que fueron agrupados bajo el mismo nombre. Una hibridación posterior con la sonda ddB47 hizo posible la confirmación

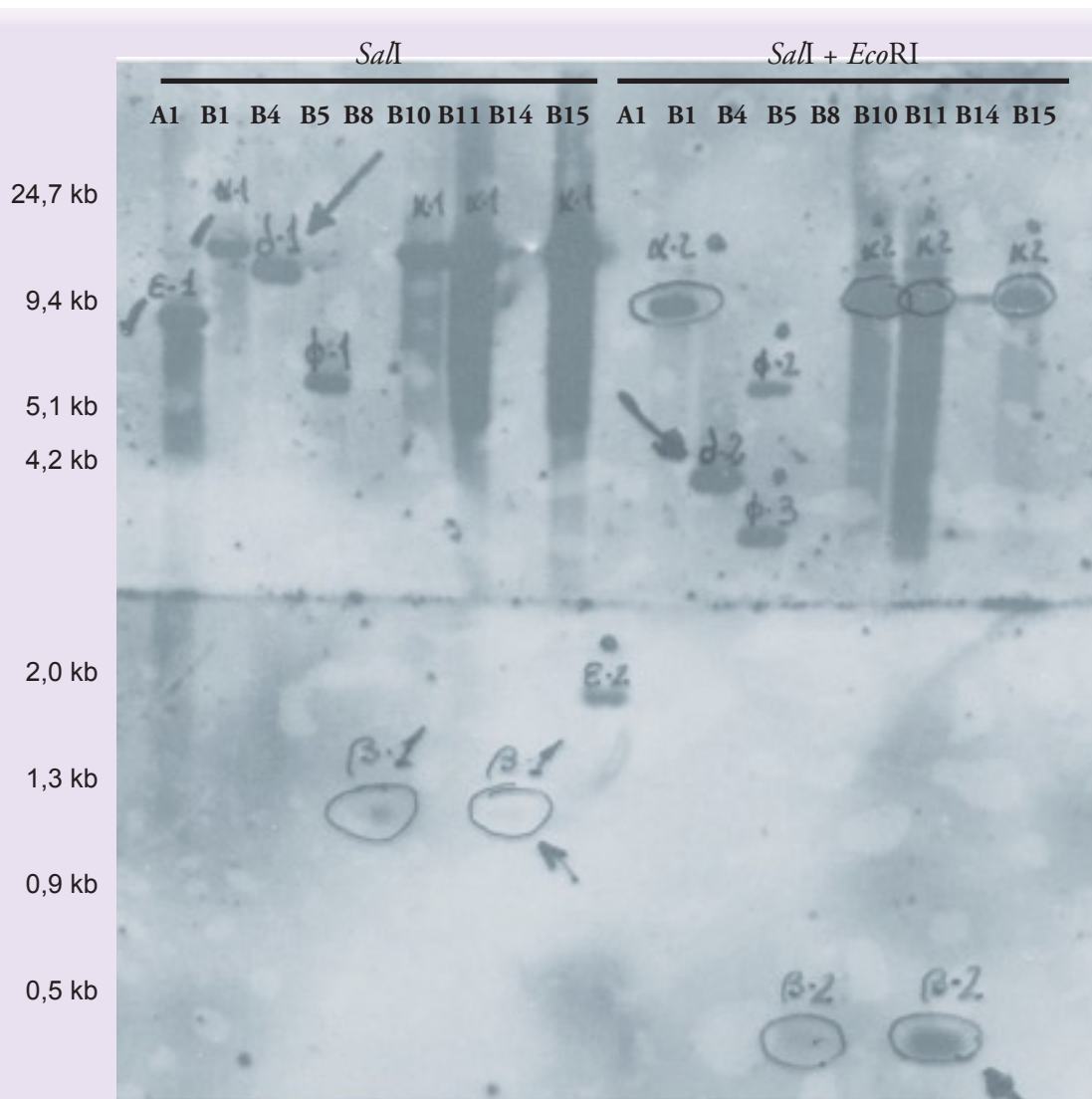


Fig. 15.1

DNA de los fagos A1, B1, B4, B5, B8, B10, B11, B14 y B15 digerido con *SalI* y *SalI+EcoRI*, fraccionado en gel de agarosa (0,7% w/v) y transferido a una membrana Hybond N.

El filtro fue hibridado con la sonda ddB47 a 62° C y lavado con 1 x SSC y 0,5 x SSC.

Se indican los tamaños del marcador de tamaño

de que se estaba trabajando con fagos con el mismo fragmento de DNA clonado y la identificación de posibles insertos de interés. La Figura 15.1 muestra el análisis mediante hibridación de los fagos A1, B1, B4, B5, B8, B10, B11, B14, B15 con la sonda ddb47. El fago A1 contiene material genético del gen Bde47A y se utiliza como control positivo.

Como se puede observar, los fagos B1, B10, B11 y B15 son idénticos y contienen los insertos denominados α . También son idénticos entre sí los fagos B8 y B14, que contienen los fragmentos denominados β , y los fagos B7 y B12 entre sí (analizados mediante hibridación en otra membrana que no presenta en esta memoria), que contienen los insertos η . El resto de los fagos analizados son únicos. El análisis de los patrones de hibridación permitió, de esta manera, identificar varios insertos candidato para su aislamiento, posterior clonación en pBlueScripIISK y secuenciación. (Tabla 15.I)

Los plásmidos resultantes de clonar los fragmentos aislados fueron digeridos con diversas

FAGO	INSERTO	Digestión	Tamaño (kb)	Plásmido
B1,B10,B11,B15	α -2	<i>SaII-EcoRI</i>	9,8	pDBP-1
B8, B14	β -1	<i>SaII-SaII</i>	1,1	pDBP-5
B8, B14	β -2	<i>SaII-EcoRI</i>	$\approx 0,4$	No clonado
B4	δ -2	<i>SaII-EcoRI</i>	4,8	pDBP-6
B4	δ -2	<i>SaII-SaII</i>	10	pDBP-7
B5	ϕ -2	<i>SaII-EcoRI</i>	7	pDBP-4
B5	ϕ -3	<i>SaII-EcoRI</i>	3,2	pDBP-2
B6	Ψ -2	<i>SaII-EcoRI</i>	4	pDBP-8
B7, B12	η -2	<i>SaII-EcoRI</i>	8,5	pDBP-9
A1	ϵ -2	<i>SaII-EcoRI</i>	1,9	pDBP-3

Tabla 15.I
Insertos elegidos y plásmidos donde fueron clonaron

enzimas para su posterior hibridación Southern con la sonda ddb47 y para comprobar que realmente incluían el fragmento detectado en la hibridación del filtro con DNA de los fagos (datos no presentados). De esta manera, además, se localizaron también subfragmentos de restricción dentro del fragmento clonado inicialmente en los plásmidos pDBP que hibridaban con la sonda ddb47 para su posterior caracterización. Los plásmidos pDBP2 y pDBP4 no dieron señal en esta comprobación, por lo que se eliminaron del estudio. El plásmido pDBP-3, que deriva del fago A1, contenía un fragmento perteneciente al gen Bde47A, razón por la cual ya no se profundizó en su caracterización.

Una observación detallada de secuencias parciales obtenidas de los fragmentos clonados en estos plásmidos junto con la búsqueda de homologías entre ellos mediante el uso de herramientas bioinformáticas, permitió deducir que los plásmidos pDBP6, pDBP7 y pDBP8 contienen fragmen-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

tos derivados de la misma región genómica, mientras que el resto de plásmidos derivan cada uno de ellos de secuencias ubicadas en una región diferente del genoma.

Mediante la herramienta BLASTn del servidor del BROAD Institute se buscaron correspondencias en el genoma de *B. cinerea* para los fragmentos clonados, hallándose similitudes a distintos niveles de homología con las proteínas que se muestran en la tabla 15.II.

Plásmido	S contig	Proteína	Tipo proteína	Tamaño aa' (nt)
pDBP-1	3	BC1G_01003	predicted protein	146 (438)
		BC1G_01004	hypothetical protein	443 (1329)
		BC1G_01005	Hypothetical protein similar to UDP-glucose,sterol transferase	316 (948)
pDBP-3	60	BC1G_09402	conserved hypothetical protein (BDE47A)	
pDBP-5	88	BC1G_11256	hypothetical protein similar to large secreted protein	491 (1473)
		BC1G_11257	hypothetical protein similar to hexose transporter	506 (1518)
	157	BC1G_14402	conserved hypothetical protein	682 (2046)
pDBP-6 pDBP-7 pDBP-8	25	BC1G_05412	12-oxophytodienoate reductase 1	414(1242)
		BC1G_05413	predicted protein	154 (465)
		BC1G_05414	predicted protein	50 (150)
		BC1G_05415	conserved hypothetical protein	139 (417)
pDBP-9	198	BC1G_15782	conserved hypothetical protein	599(1797)
		BC1G_15783	hypothetical protein similar to leucine carboxyl methyltransferase family protein	387(1161)

Tabla 15.II

Proteínas anotadas automáticamente en el genoma de *B. cinerea* que se corresponden con las secuencias clonadas en los plásmidos DBP.

Nuestra estrategia experimental proponía subclonar a continuación fragmentos de cada uno de los plásmidos así generados, completar su secuenciación, identificar las regiones ricas en A+G en

cada caso y generar sondas a partir de las regiones flanqueantes de estas últimas. Decidimos no avanzar de momento en esta última fase porque fue posible disponer entonces de la secuencia del genoma de *B. cinerea* B05.10 y T4, lo que nos permitía aplicar directamente la aproximación bioinformática que presentamos a continuación y que, en cualquier caso, nos facilitaría la identificación de las regiones genómicas clonadas en los plásmidos generados anteriormente a partir de la obtención de secuencias parciales de los extremos de los fragmentos clonados en los mismos sin necesidad de secuenciar los insertos completos.

15.2. Análisis bioinformático

Como hemos indicado anteriormente, durante la realización de nuestro trabajo se han puesto a disposición de la comunidad científica distintas bases de datos con información sobre la secuencia del genoma de distintas cepas de *B. cinerea*. Inicialmente se trató de secuencias derivadas de genotecas de cDNA de *B. cinerea* cultivado en medios de cultivo artificiales en condiciones de limitación de nitrógeno (URGI) (Viaud et al., 2005). Posteriormente se construyeron y secuenciaron distintas genotecas de cDNA obtenidas a partir de poblaciones de RNA mensajeros derivados de cultivos en distintas fases de desarrollo, genotecas proporcionadas por distintos grupos del consorcio de laboratorios que ha participado en el proyecto de secuenciación del genoma de *B. cinerea* y de *S. sclerotiorum*. Finalmente se ha secuenciado el genoma completo de las cepas T4 y B05.10 de *B. cinerea* (Broad Institute

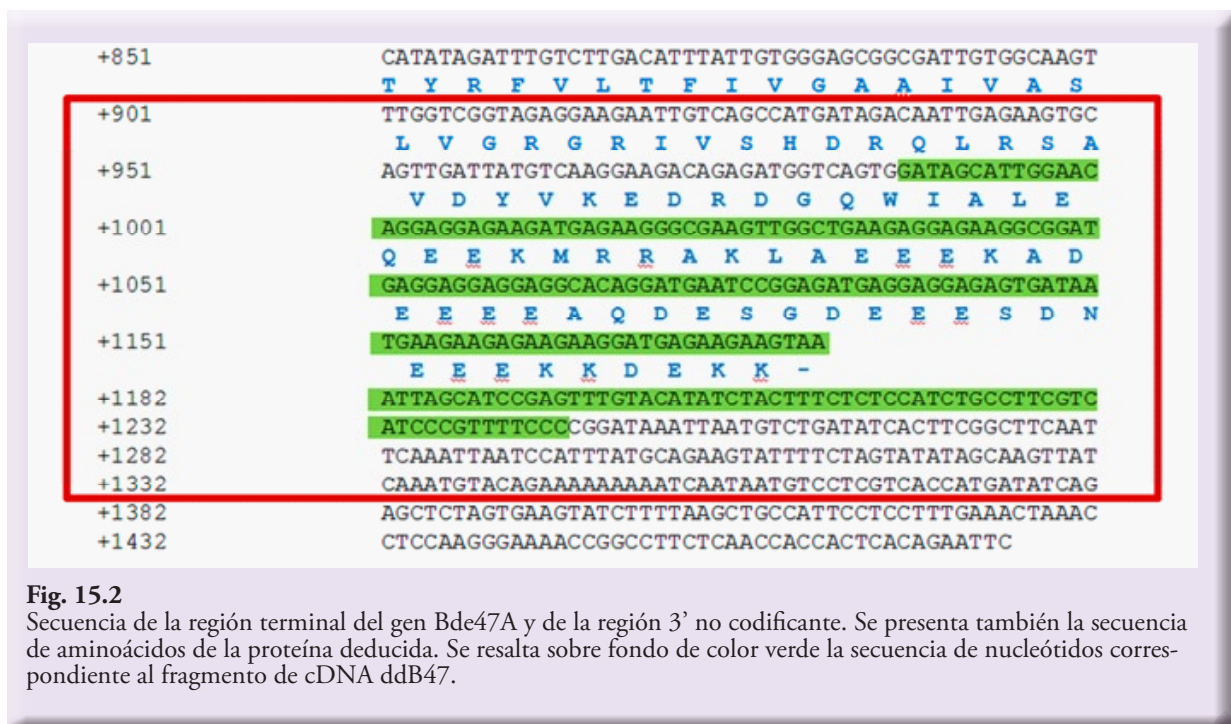


Fig. 15.2 Secuencia de la región terminal del gen Bde47A y de la región 3' no codificante. Se presenta también la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Se resalta sobre fondo de color verde la secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento de cDNA ddB47.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

data base) y se han generado también genotecas a partir de muestras de material vegetal infectado con *B. cinerea*. La disponibilidad de toda esta información ha permitido aplicar una estrategia bioinformática para tratar de aislar el gen Bde47B que podemos considerar complementaria a la aplicada anteriormente.

Cuando se analiza la secuencia del fragmento ddb47 se comprueba que se trata de una secuencia con una organización particular (Figura 15.2). Es una región rica en los nucleótidos de Adenina y de Guanina. En el gen Bde47A, esta secuencia corresponde a la región terminal de la región codificante y al comienzo de la región 3' no codificante (Ver Figura 15.2).

Un análisis detallado del mismo (del fragmento ddb47) nos permite distinguir dos regiones en su secuencia: la región correspondiente a la región codificante del gen Bde47A, con un contenido (A+G) de 88.23%, y la región correspondiente a la región 3' no codificante del gen Bde47A, con un contenido (A+G) de 26.5%. (Ver Figura 15.3). Este alto contenido en (A+G) (y su distribución)

	5'-no codif. (535 nt)	Exón 1 (564 nt)	Intrón (57 nt)	Exon 2 (510 nt)	3'-no codif. (294 nt)	Fragmento completo (1960 nt)
G + C %	44,11	46,27	33,33	47,25	37,75	44,28
A + G %	44,11	45,39	45,61	59,41	43,53	48,41

ddb47

Región codificante de Bde47A (145 nt)

GATAGCATTGGAACAGGAGGAGAAGATGAGAAGGGCGAAGTTGGCTGAAGAGGAGAAGGCCGGATGAGGA-GGAGGAGGCACAGGATGAATCCGGAGATGAGGAGGAGAGTGATAATGAAGAAGAGAAGAAGGATGAGAA-GAAGTAA

Región 3' - no codificante (64 nt)

attagcatccgagtttgtacatatctactttctctccatctgccttcgctcatcccgtttttcccc

	Fragmento ddb47 (209 nt)	Región de ddb47 de la re- gión codificante de Bde47A	Región de ddb47 de la región 3' no codificante de Bde47A
G + C %	47,36	52,05	45,2
A + G %	65,55	88,23	26,5

Fig. 15.3

Contenido [G+C] y [A+G] en las distintas regiones que podemos establecer en el gen Bde47A (Tabla de la parte superior) y en el fragmento ddb47 (Tabla de la parte inferior). En la parte central de la figura se presenta la secuencia de nucleótidos del fragmento ddb47 que, en el gen Bde47A, cubre parte de la región codificante y parte de la región 3' no codificante.

en la zona correspondiente a la región terminal de la región codificante de Bde47A determina una abundancia del codón “GAG” que aparece repetido dando lugar a una secuencia similar a la de un “microsatélite”. La abundancia de codones GAG explica la relativa abundancia del aminoácido ácido glutámico (E) en la región terminal de la proteína codificada por el gen Bde47A, y que condiciona el carácter ácido de la misma.

La primera colección de datos sobre la secuencia del genoma de *B. cinerea* fue generada por la empresa Syngenta trabajando con la cepa tipo silvestre B05.10. Se secuenció una genoteca de fragmentos de DNA genómico que se depositó en el servidor de la Unidad de Investigación de Información Genómica (URGI) del Instituto Nacional de Investigación Agraria de Francia (<http://urgi.infobiogen.fr>) sobre la que se llevó a cabo una búsqueda bioinformática de secuencias similares, pero no idénticas, a la secuencia del fragmento ddb47 mediante BLASTN. En un principio la búsqueda se llevó a cabo aplicando condiciones que permitían detectar secuencias de nucleótidos estrictamente homólogas. Con éstas se identificaron cuatro clones que mostraban identidad en una parte de su secuencia con el fragmento ddb47. A continuación se llevó a cabo el mismo análisis aplicando condiciones que permitían detectar variaciones, en mayor o menor medida, con la secuencia de interés, en nuestro caso el fragmento ddb47. La aparición de variaciones en relación con la secuencia de interés implicaba determinados niveles de penalización (seleccionados en el momento de establecer los parámetros de búsqueda) que permitían ordenar las secuencias detectadas como similares en función del grado de conservación o similitud en relación con la secuencia de interés.

La Figura 15.4 muestra los clones detectados, y el orden establecido, cuando se aplicaron condiciones estándar de búsqueda (standard filtering and masking conditions) y la penalización correspondiente a un error de un nucleótido. Se comprueba que los cuatro primeros clones detectados presentan identidad con el clon ddb47. Representan, por lo tanto, clones que incluyen secuencias de regiones parciales del gen Bde47A. Nuestro interés se centró en las secuencias ordenadas a continuación que, teniendo en cuenta las condiciones de búsqueda utilizadas, deben representar secuencias similares, pero no idénticas, a la secuencia de ddb47 y ordenadas en función de su similitud con ésta última. Es interesante destacar que cuando se analiza la homología de estas secuencias con la secuencia de ddb47 se comprueba que los alineamientos se producen en la región de ddb47 correspondiente a la región codificante del gen Bde47, no en la secuencia correspondiente a la región 3' no codificante.

El análisis BLASTN fue ampliado permitiendo niveles mayores de diferencia aumentando el nivel de penalización. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó una serie de secuencias si-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

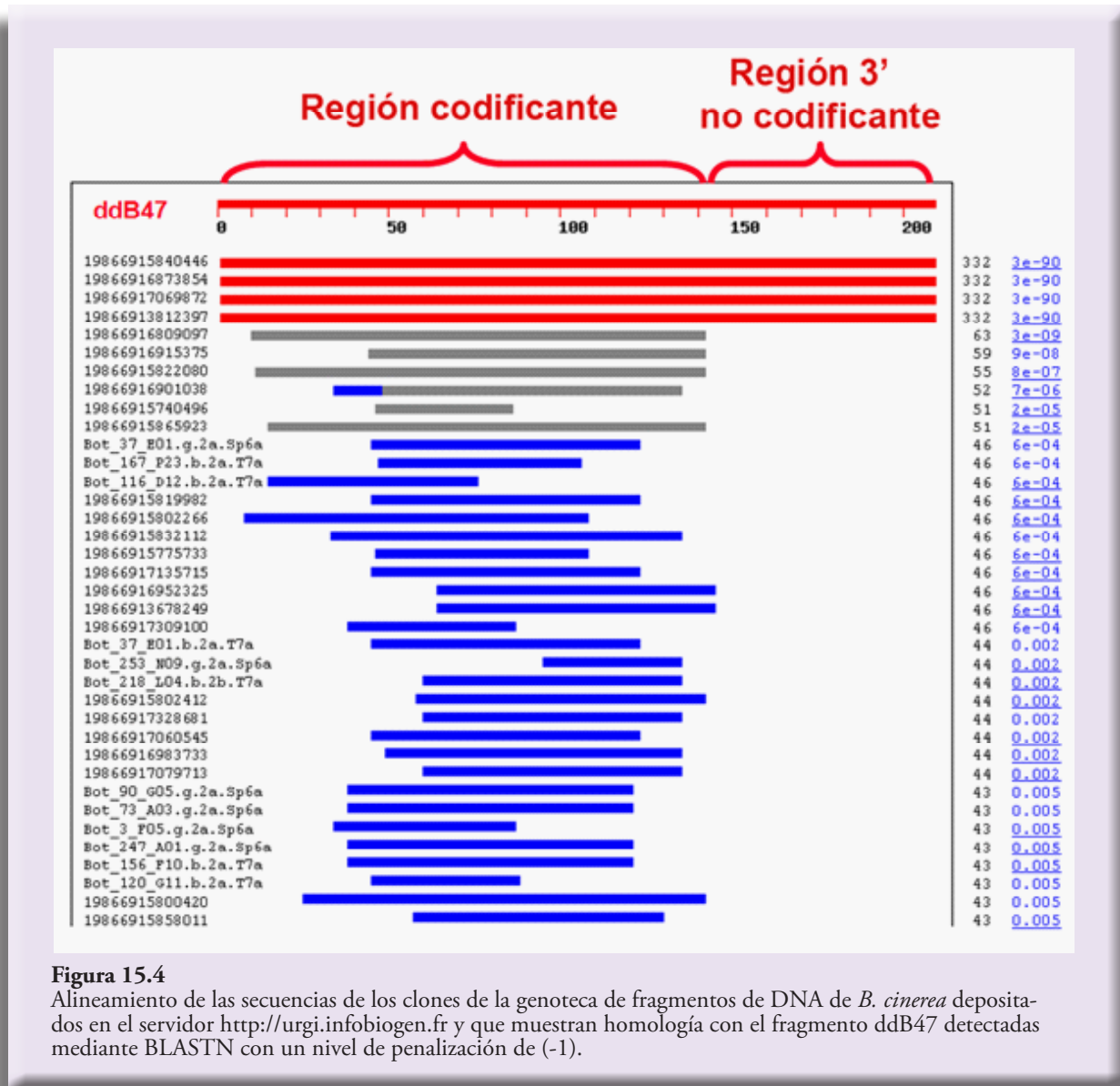


Figura 15.4

Alineamiento de las secuencias de los clones de la genoteca de fragmentos de DNA de *B. cinerea* depositados en el servidor <http://urgi.infobiogen.fr> y que muestran homología con el fragmento ddB47 detectadas mediante BLASTN con un nivel de penalización de (-1).

milares a ddB47 ordenadas en función de su similitud con ésta última. De entre las secuencias identificadas fueron obviadas las que representaban al gen Bde47A y fueron seleccionadas las secuencias con niveles de similitud significativos. Las secuencias de los clones seleccionados fueron analizadas buscando posibles solapamientos (o identidades) y fueron, además, enfrentados de nuevo frente a la información depositada en la base de datos del genoma de *B. cinerea* B05.10. El objetivo de este análisis era generar un listado de secuencias únicas con homología a la secuencias ddB47, secuencias que incluyeran además las regiones flanqueantes a la región de homología, para disponer de secuencias específicas de cada una de ellas. La revisión y el ensamblaje manual de cada clon elegido se realizó gracias a la herramienta ContigExpress de la suite Vector NTI Advance 10.3.0. Un ejemplo representativo de esta revisión y ensamblaje manual con las secuencias consideradas para dar lugar fi-

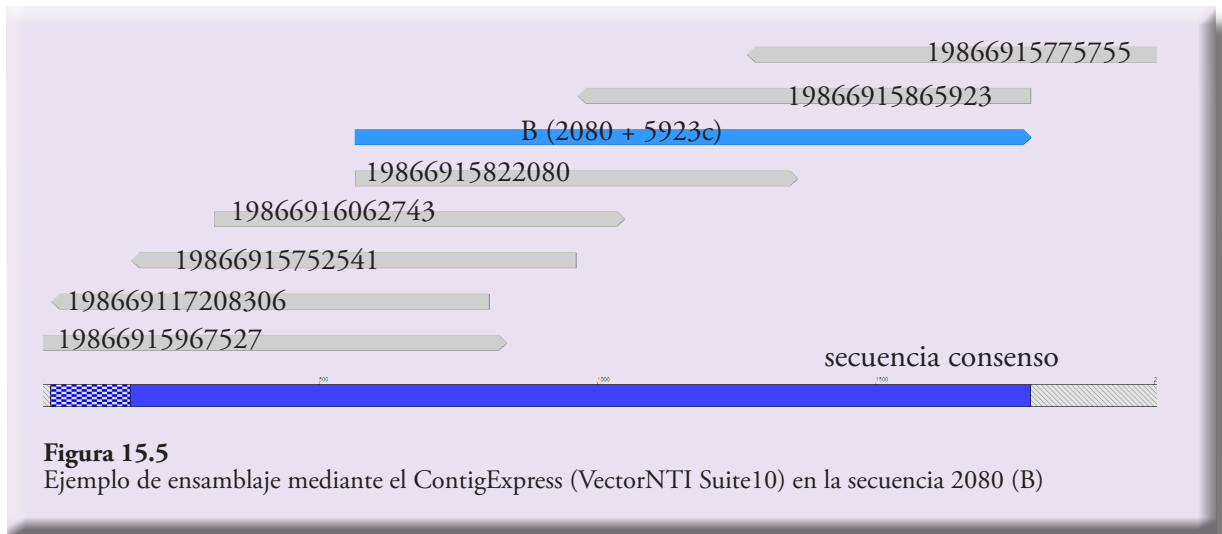


Figura 15.5
Ejemplo de ensamblaje mediante el ContigExpress (VectorNTI Suite10) en la secuencia 2080 (B)

nalmente a la secuencia de código B (2080) se presenta en la Figura 15.5.

Este análisis dió como resultado un total de doce regiones ricas en (A+G) que presentaban una similitud significativa con la secuencia del fragmento ddB47 (Tabla 15.III).

La Figura 15.6 muestra una representación gráfica del alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las 12 regiones ricas en A+G seleccionadas con la secuencia del fragmento ddB47. Fueron éstas las secuencias seleccionadas para posteriores análisis.

0496	2266	5375	5733
19866915740496	19866916938086 19866915802266	19866916915375 19866917029190 19866917081888 Bot_223_H16.b.2a.T7a	19866917212550 19866915775733
9097	9100	Bot_116	Bot_167
Bot_154_H24.g.2a.Sp6a 19866917135014 19866916809097	19866916948702 19866915884337 19866917309100	Bot_116_D12.b.2a.T7a	Bot_232_N23.g.2a.Sp6a Bot_167_P23.b.2a.T7a
Bot_37 (A)	2080 (B)	2325 (C)	1038 (D)
Bot_37_E01.g.2a.Sp6a 19866917135715 19866915819982	19866915775755 19866915865923 19866915822080 19866916062743 19866915752541 19866915967527 19866917208306	19866913678249 19866916952325	19866915819982 19866917135715 19866916901038

Tabla 15.III
Clones utilizados para el ensamblaje, corrección y completado de las secuencias elegidas.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

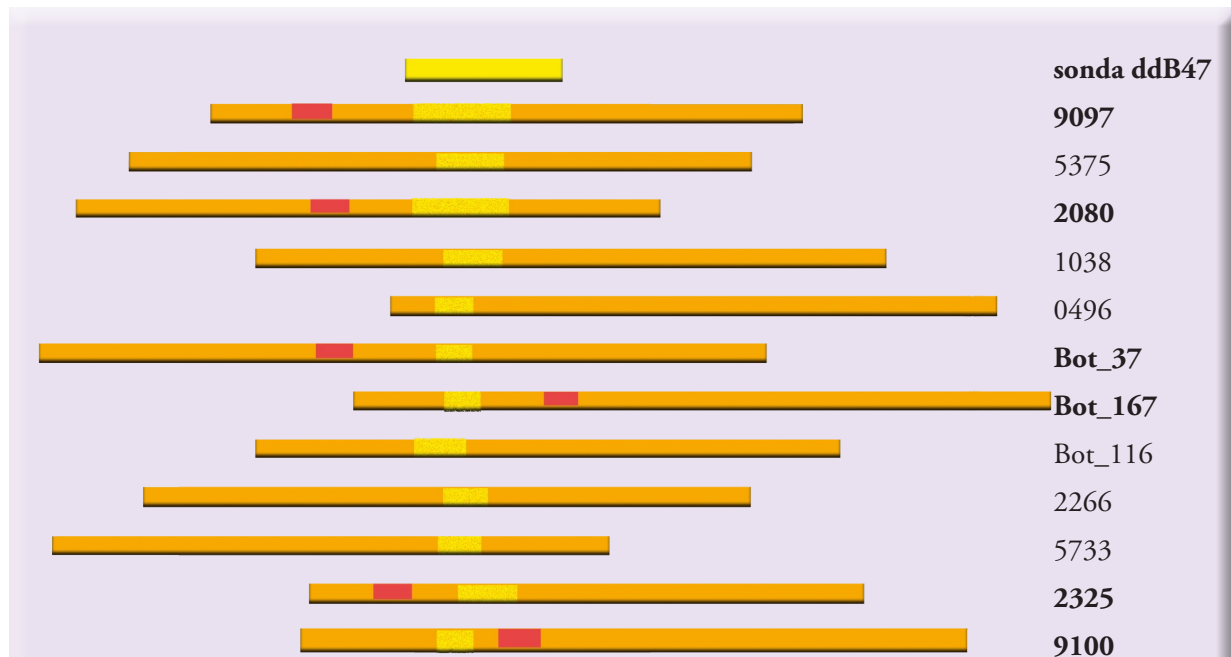


Fig. 15.6

Representación gráfica de las secuencias anotadas. En amarillo se representa la zona de máxima homología con la secuencia de la sonda ddB47. En rojo, la zona que sirvió de molde para la síntesis de la sonda de PCR para las hibridaciones Northern posteriores.

Se comprueba que fue posible disponer de información sobre las secuencias que flanquean en cada caso la región rica en A+G. Estas secuencias fueron utilizadas en nuestra aproximación experimental con dos objetivos concretos.

En primer lugar, las secuencias resultantes seleccionadas fueron traducidas en todas las posibles fases de lectura buscando posibles marcos de lectura que pudieran corresponder con un gen en la zona de interés. Para asegurar la calidad de la anotación manual llevada a cabo en nuestro laboratorio se compararon estas secuencias con las secuencias generadas durante la anotación automática que estaba llevando a cabo el BROAD Institute. La anotación automática del BROAD Institute resultó de gran ayuda para completar o eliminar indeterminaciones en las secuencias, aunque en algunos casos presentaba huecos (gaps) e incongruencias o indeterminaciones con respecto a nuestras secuencias.

En segundo lugar, una vez las secuencias estuvieron aseguradas y comprobadas, se diseñaron oligonucleótidos para generar sondas específicas para cada secuencia, sondas que serían utilizadas en hibridaciones Northern para detectar la expresión de un posible gen que codificara un mensajero del tamaño esperado y con el patrón de expresión detectado originalmente (el característico del gen que hemos denominado Bde47B). Estas sondas se localizarían en regiones adyacentes a la zona rica en "GA" y en la dirección para la cual la fase abierta de lectura detectada tuviera sentido.

La Tabla 15.IV muestra las secuencias elegidas, los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el fragmento relacionado con cada secuencia y el supercontig deducido por el BROAD Institute que contiene la secuencia elegida. En algunos casos, fue necesario rediseñar los oligonucleótidos utilizados (C y D) debido a la imposibilidad de generar, mediante PCR, un fragmento de ADN con los oligonucleótidos diseñados inicialmente (A y B).

Secuencia	Oligos	Secuencia oligos (5'-3')	SuperContig
0496	0496-A (Frw)	TGGTTGTCATGCGATGTTGG	1.208
	0496-B (Rev)	CAATTCAACCCAGCTTCCC	
2266	2266-A (Frw)	AGTTCTCACACAAGGAACGG	1.25
	2266-B (Rev)	TTTGGTCCCTCGGTACATCG	
5375	5375-A (Frw)	CGTCGTTACGCCGCTTCTAC	1.30
	5375-B (Rev)	TGCGAAGCTGATGGGAATCC	
5733	5733-A (Frw)	GGATAGATAACTCCTCCGTC	1.100
	5733-B (Rev)	CCACATCCACAACCACATGC	
	5733-C (Frw)	GTGCTGGTGCTGTTATTAGG	
	5733-D (Rev)	CCATACACAGTATCCAAATCC	
9097	9097-A (Frw)	CACCGGCTCTTGGCATACTG	1.208
	9097-B (Rev)	TCCAATTCCTTGCCACCATC	
9100	9100-A (Frw)	TAGATTAAGCAGCCGATGGC	1.198
	9100-B (Rev)	CGATCTCTATCAAAGCGAGC	
Bot_116	Bot_116-A (Frw)	TAGTGA AAAATTCGCGGGACG	1.4
	Bot_116-B (Rev)	GTCAGATTCAGATGGACCGC	
	Bot_116-C (Frw)	AGGGTAGGGGGTATGGGATG	
	Bot_116-D (Rev)	GTACGATTCATAACGCGAGC	
Bot_167	Bot_167-A (Frw)	CGAATGACAACCCATCTTGG	Excluded reads
	Bot_167-B (Rev)	CGAGGTAAAGCGCTGTACAG	
	Bot_167-C (Frw)	AGGGTAGGGGGTATGGGATG	
	Bot_167-D (Rev)	GTACGATTCATAACGCGAGC	
Bot_37 (A)	Bot_37-A (Frw)	TCTGGGAAGAAGCTTAGTCC	1.23
	Bot_37-B (Rev)	CTCCTCAGCAGATTCTTCGG	
2080 (B)	2080-A (Frw)	TGAAGCATTCGAAGCTCGCG	1.2
	2080-B (Rev)	TCTGTCTCCTCATCGGCATC	
2325 (C)	2325-A (Frw)	GCTGTTGCTGTGGAAGTTGG	1.158
	2325-B (Rev)	ATTTTCCAAGCGACGCCGAG	
1038 (D)	1038-A (Frw)	GGGTTGACATTACTTCTGGC	1.100
	1038-B (Rev)	GCAAGTAGTATCGTATCTCCG	

Tabla 15.IV
Oligonucleotidos que se utilizaron para sintetizar las sondas de las zonas adyacentas a regiones ricas en “GA”

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Un total de seis sondas fueron generadas mediante PCR, correspondientes a las secuencias 9097, 2080, Bot_37, 9100, 2325, Bot_167. Estas sondas generadas fueron utilizadas en experimentos de hibridación en condiciones moderadamente restrictivas con membranas que contenían RNA de *B. cinerea* cultivado *in vitro* y RNA de la interacción *B. cinerea*-tomate a las 96 horas y a las 120 horas de infección. La muestra de RNA de la interacción a las 120 hpi muestra un nivel de degradación importante, como se comprueba en la Figura 15.7. Como hemos podido comprobar repetidamente en el curso de numerosos experimentos de infección, obtener RNA total de calidad a partir de tejidos infectados a tiempos tan tardíos resulta muy difícil porque los tejidos infectados están muy macerados y deteriorados. No obstante, hemos incluido la muestra correspondiente junto con la muestra de 96 hpi por considerar que pudiera resultar de interés para identificar el gen que hemos denominado Bde47B. Los resultados de dichas hibridaciones se presentan en la Figura 15.7. Se comprueba que con las sondas 2325 y Bot167 no se obtuvieron señales de hibridación que pudieran ser consideradas en nuestro análisis de expresión. En la figura se comprueba también que en las otras cuatro hibridaciones se detectan claramente señales de hibridación definidos por lo que nos permite proponer que estas cuatros sondas detectan la expresión de otros tantos genes. No obstante,

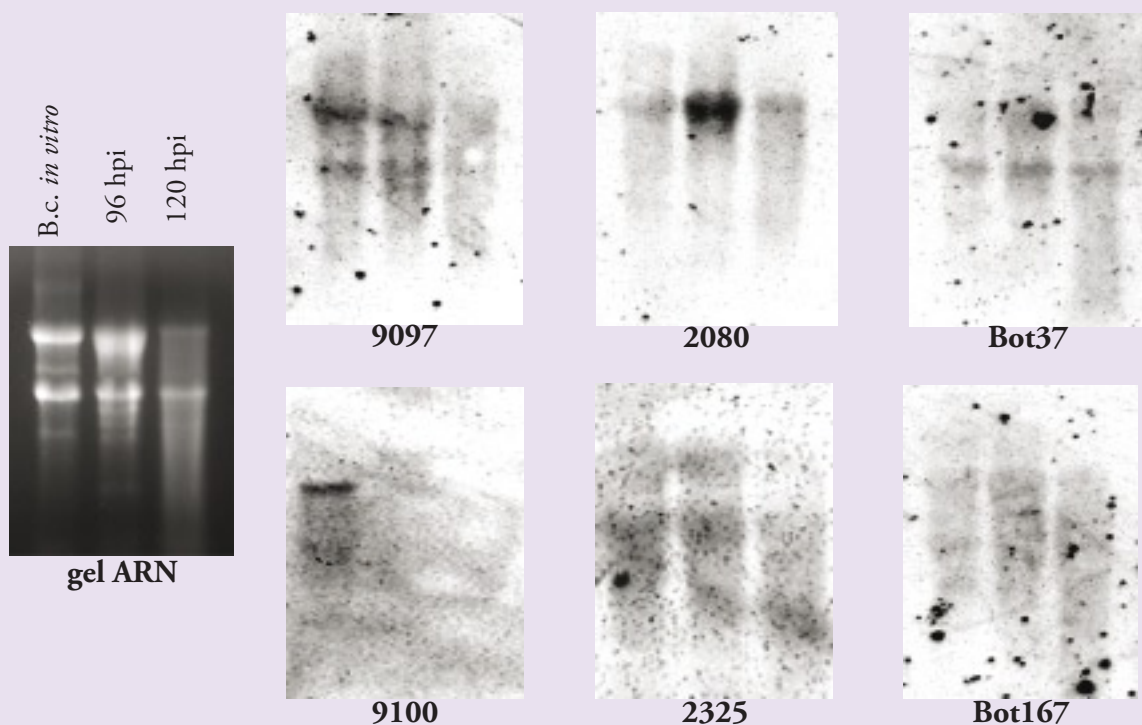


Fig. 15.7 Hibridaciones Northern llevadas a cabo con sondas derivadas de los fragmentos 9097, 2080 Bot37, 9100, 2325 y Bot167. Los filtros contenían RNA de *B. cinerea* cultivado *in vitro* (*B.c. in vitro*) y RNA total de la interacción *B. cinerea* - tomate preparado a partir de hojas infectadas y recogidas 96 y 120 hpi.

un análisis de los patrones de expresión obtenidos demuestra que en ninguno de los cuatro casos se trata del patrón de expresión esperado para un RNA mensajero también del tamaño esperado (el codificado por el gen Bde47B).

La sonda 9100 deriva de un gen que sólo se expresa en las condiciones de cultivo *in vitro* utilizadas como referencia, no detectándose expresión en las muestras derivadas de material vegetal infectado (expresión *in planta*). Con la sonda 9097 se detectan señales de hibridación que parecen resultar derivadas de hibridación (específica o inespecífica) con RNA ribosómico, razón por la cual esta hibridación consideramos que no ofrece información relevante.

La sonda 2080 deriva de un gen que muestra un nivel de inducción de la expresión importante *in planta* a las 96 hpi.

Finalmente, con la sonda Bot37 se detectan señales de hibridación de intensidad similar en las tres muestras analizadas. Teniendo en cuenta que en la muestra derivada de la interacción a las 96 hpi, sólo el 25-30% del ARN total es ARN del hongo, es posible considerar que en este caso el gen cuya expresión nos permite detectar esta sonda muestra un nivel de inducción de aproximadamente 4-5 veces en las condiciones analizadas.

Un análisis bioinformático de las secuencias alrededor de las sondas correspondientes a los clones 9100, 9097, 2080 y Bot_37 mediante BLAST frente a la anotación automática del genoma de *B. cinerea* a nuestra disposición a través del servidor del BROAD Institute reveló ciertas homologías con diversas proteínas deducidas y anotadas automáticamente. Estas proteínas fueron contrastadas mediante BLASTP con las secuencias depositadas en diversas bases de datos públicas tratando de identificar posibles homologías y dominios conservados.

Con la secuencia correspondiente a la sonda denominada 9100 no se identificó ninguna homología significativa con secuencias depositadas en las bases de datos.

Con la secuencia 9097 se detectó una alta homología con la proteína codificada por el gen BC1G_15761.1, en cuya anotación automática se indica que se trata de una proteína que parece estar relacionada con proteínas que presentan el dominio BAT2 (HLA-B-associated transcripts). Este dominio está presente en genes que codifican para proteínas muy ricas en prolina que comparten similitudes con proteínas reguladoras de transcripción que contienen motivos dedo-de-zinc y regiones ricas en glutámico, como ocurre en Bde47A.

Pero son los resultados derivados del análisis de las secuencias correspondientes a los fragmentos 2080 y Bot_37 los que presentan un mayor interés. La secuencia de la que deriva la sonda 2080 es idéntica a la secuencia del gen BC1G_00665.1. La búsqueda de secuencias homólogas a la proteína deducida codificada nos proporciona como resultado una serie de proteínas hipotéticas de

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

hongos relacionadas con la proteína mitocondrial procesadora de RNA mitocondrial PET127, cuyas secuencias se caracterizan por incluir el dominio pfam08634.

Por su parte, la secuencia correspondiente a la sonda Bot_37 se deriva de la secuencia del gen identificado en la anotación automática del genoma de *B. cinerea* como BC1G_04929.1. La proteína deducida presenta una gran homología con proteínas de tipo helicasa/ATPasa de la familia SNF2, y un análisis de dominios funcionales demuestra que incluye regiones con una homología muy elevada con los dominios smart00487, pfam00176 y COG0553, presentes en esta superfamilia proteica.

Aunque la aproximación bioinformática empleada ha permitido identificar genes estructuralmente similares al gen Bde47A, la consideración del tamaño de los ARN mensajeros codificados y de los patrones de expresión correspondientes indica que hasta el momento no ha sido posible identificar el gen que estamos tratando de aislar, el gen Bde47B. El tamaño de los ARN mensajeros detectados en ningún caso parece ser inferior a los 1.000 nt, tamaño máximo estimado inicialmente para este mensajero. El análisis bioinformático llevado a cabo indicó que sólo en el caso de las secuencias 2266 y 2325 la anotación automática del genoma de *B. cinerea* predice un tamaño del RNA mensajero codificado inferior a 1000 nt.

Derivada de la secuencias 2325 sí se ha preparado una sonda, pero la hibridación correspondiente, como hemos indicado anteriormente, no ofrece resultados de interés, puesto que la hibrida-

	Scotig		nucleotidos		aa'	
BC1G_14925.1	158: 40028-40441		414 nt		125aa'	
	1	10	20	30	40	50
+1						
	ATGTGTGGAGGTGGTGGTGC	AATTTATGGGCTGTTTACAT	gtaaggggg			
	M	C	G	G	G	G
	A	N	L	W	A	V
	Y	M				
+51	tgcgcggtattg	ttggatgagggatgag	GGATGAGGGAGGAGGGATCTTTC			
			D	E	G	G
			G	I	F	
+101	TTGGGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAG					
	L	G	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+151	GAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGA					
	E	E	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+201	AGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAG					
	E	E	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+251	AGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAG					
	E	E	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+301	GAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGA					
	E	E	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+351	AGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAATATAGAT					
	E	E	E	E	E	E
	E	E	E	E	E	E
+401	ATGTGATGTGGTAG					
	Y	V	M	W	*	

Figura 16.8
Secuencia BC1G_14925.1

ción en este caso no tuvo lugar de manera satisfactoria (o la sonda no fue amplificada y marcada de manera apropiada o se produce cierto nivel de hibridación inespecífica con RNA ribosómico que enmascara la señal de hibridación auténtica). El gen del que esta secuencia deriva, BC1G_14925.1, codifica una proteína que presenta una amplia región rica en ácido glutámico (E) que representa más del 75% del total de la proteína. La comparación y la búsqueda de homologías con esta proteína en las bases de datos públicas no permitió generar información ni resultados dignos de mención.

A partir de la secuencias 2266 se sintetizó una sonda que también fue utilizada en experimentos de hibridación. En este caso, la hibridación no generó ningún resultado (y la imagen del filtro correspondiente no se presenta en este trabajo). La secuencia en el genoma de la que deriva corresponde al gen identificado como BC1G_05413.1 codifica una proteína de 154 aa', pero su comparación con las bases de datos públicas no permite identificar homologías significativas. La Figura 16.10 muestra la secuencia de nucleótidos del gen BC1G_05413.1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Es interesante destacar que la secuencia del gen BC1G_05413.1 es

	Scotig		nucleotidos	aa'			
BC1G_05413.1	25: 221048-221613 (+)		566 nt	154 aa'			
	1	10	20	30	40	50	
+1	ATGGATTTTTCCAAAGTACCAAAGGCGAAGCCCATATCTGCGAAGAAAGC						
	M D F S K V P K A K P I S A K K A						
+51	AGCTCAGTATAACAAGATATTTGATGATCCGCAAAAGATGAAGGAGATAT						
	A Q Y N K I F D D P Q K M K E I						
+101	TTGAACAATGCGAGGCgtccggctcgttgggctgctggggggtgcaggggtg						
	F E Q C E A						
+151	gatgggcgggggtgctccgatgtaccgagggaccaaaccggaggggattgt						
+201	tgaaaaagaagaagaagAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG						
	G G G G G G G G G G G G						
+251	AAGAGGAGGAGGAGGAGAAGAGGAGGAGTTGATAGCTTCAAAGTACTTCA						
	R G G G G E E E E L I A S K Y F						
+301	AGAAGGGAGCTGGAACGAACTCAAGGATCCAGAGAAGAAGATGGAGAAA						
	K K G A G T K L K D P E K K M E K						
+351	TTTGGGGCCCGAGTAAGAATTCCAACTTGCTTGTGTTGAGAAATGAAGA						
	F G A G V R I P N L L V L R N E E						
+401	GGAGGGATCGGTGCTTTCACCAAGAACACCACGACCCACGTACTIONTCCGA						
	E G S V L S T K N T T T P R T P						
+451	CTGCCGAGTCTGGAACAAAAACACCCAACAGCATGACGAAGAGGCCTGC						
	T A E S G T K N T Q Q H D E E A C						
+501	CATTATCAATCTGCAATTACAATCATGTTCTCCAAGCATATTGTGCGACGC						
	H Y Q S A I T I M F S K H I V D A						
+551	CTACAATCACGAGTGA						
	Y N H E *						

Figura 16.10
Secuencia BC1G_05413.1

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

una de las secuencias identificadas en el curso de este trabajo aplicando la primera estrategia descrita basada en la hibridación en condiciones moderadamente restrictivas. Se trata concretamente de la secuencia del fragmento de ADN clonado en los plásmidos pDBP-6, pDBP-7 y pDBP-8.

16. El fragmento ddB2 y el gen Bde2

16.1. Análisis de la expresión génica

Para analizar el patrón de expresión del gen de *B. cinerea* que codifica el RNA mensajero a partir del cual se ha derivado el fragmento “ddB2” se preparó una membrana de nylon a la que se transfirieron, en cada caso, 20 µg de RNA total extraído de *B. cinerea* cultivado *in vitro*, de hojas de tomate no infectadas y de hojas de tomate inoculadas con *B. cinerea* y recogidas a distintos tiempos después de la inoculación (ver sección 10.2.b de Materiales y Métodos). La figura 16.1 muestra los resultados obtenidos en las hibridaciones llevadas a cabo con sondas derivadas del fragmento de cDNA “ddB2” de *B. cinerea* (Benito *et al.*, 1996), del gen *tubA* de *B. cinerea* (Benito *et al.*, 1998) y del gen codificador del rRNA 18S de rábano (Grellet *et al.*, 1989). La estrategia experimental aplicada para analizar y cuantificar la expresión del gen codificador del mensajero correspondiente es la misma considerada para analizar la expresión del gen Bde47A y las muestras de RNA utilizadas derivan del mismo experimento de inoculación sobre hojas de tomate utilizadas entonces. Los procedimientos y los principios expuestos en su momento son válidos para analizar los datos generados en este caso. Así, la cuantificación de las señales obtenidas en la hibridación con la sonda 18S rDNA nos per-

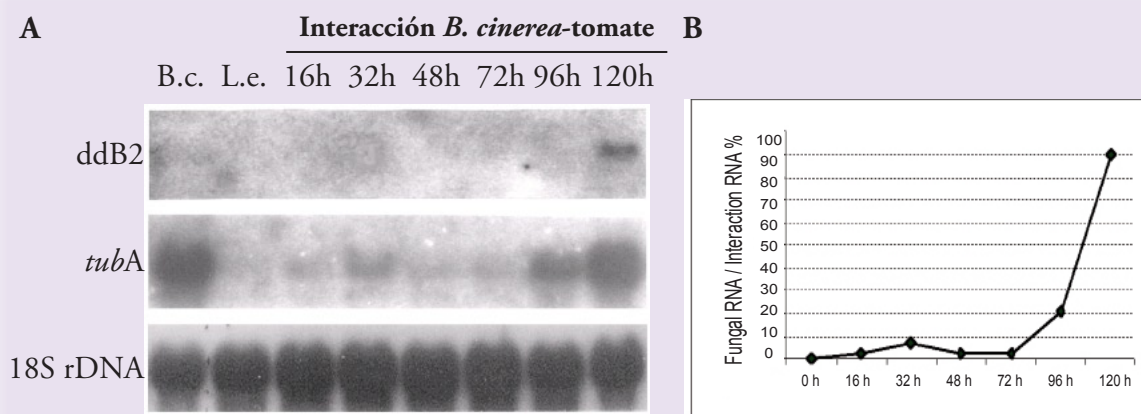


Figura 16.1

A. Análisis de expresión mediante hibridación tipo Northern sobre RNA de *B. cinerea* cultivado *in vitro* (B.c.), hojas de tomate no infectadas (L.e.), y hojas de tomate inoculadas con *B. cinerea* y recogidas a distintos tiempos después de la inoculación (Interacción *B. cinerea*-tomate), con sondas derivadas del fragmento de cDNA ddB-2, del gen *tubA* de *B. cinerea* y del rDNA 18S de rábano.

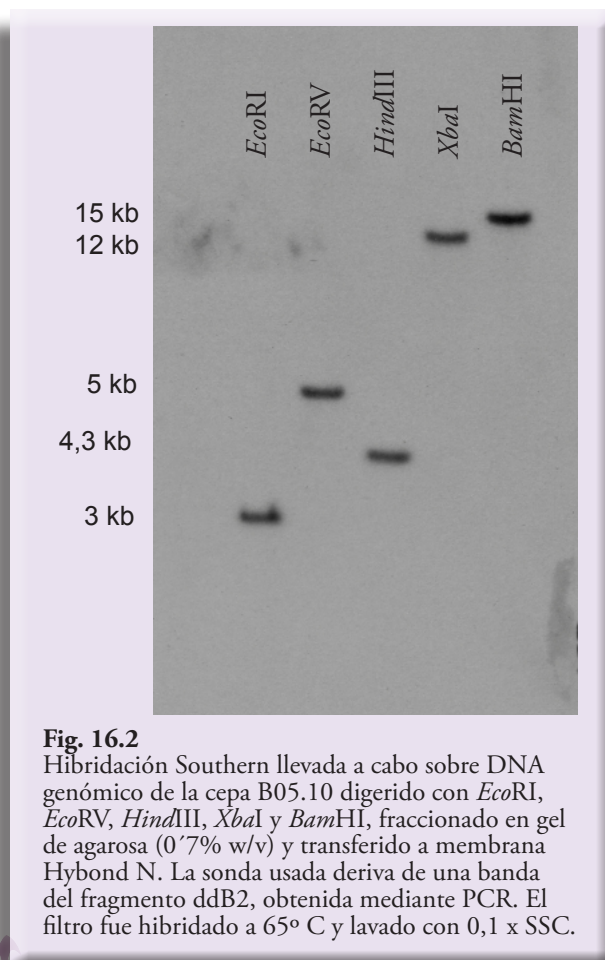
B. Estimación del progreso de la infección mediante la cuantificación de la proporción RNA fúngico / RNA de la interacción en cada momento analizado.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

mite compensar diferencias de carga entre pocillos en el gel y el estudio de las señales de hibridación obtenidas con la sonda *tubA* nos permite analizar el progreso de la infección y estimar la proporción de biomasa del hongo en relación con la biomasa total de la interacción en cada momento analizado para así poder cuantificar la expresión del gen objeto de estudio en cada momento considerado.

La hibridación realizada con el fragmento “ddb2” demuestra que el gen que codifica el RNA mensajero a partir del cual se ha generado el fragmento de cDNA ddb2 no se expresa *in vitro* (durante el crecimiento saprofítico y en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo) a niveles detectables mediante hibridación de tipo northern. Sí es posible detectar expresión del gen durante la interacción del patógeno con la planta huésped (se detecta un RNA mensajero de aproximadamente 1,8 kb de tamaño), pero únicamente en estadios muy tardíos del proceso de infección, ya que únicamente se detecta una banda de hibridación en la muestra derivada de RNA total extraído a partir de hojas infectadas y recogidas 120 hpi, fase correspondiente a una etapa de colonización y maceración masiva del tejido infectado. Puesto que no se detecta expresión durante el crecimiento saprofítico, no es posible cuantificar la expresión *in planta* del gen codificador y expresarla en relación al posible nivel de expresión *in vitro*. Siendo así, es posible considerar en este caso que estamos identificando



un gen que se expresa diferencialmente. El gen fue denominado *Bde2* (que deriva de *Botrytis* differentially expressed n° 2)

16.2. El gen codificador

Para determinar si el gen *Bde2* es un gen de copia única y para caracterizar el entorno genómico del mismo, se llevó a cabo un análisis de tipo Southern. Se utilizó un filtro de nylon (Hybond N) al que se habían transferido los fragmentos resultantes de la digestión de DNA genómico de *B. cinerea* (cepa B05.10) con las enzimas de restricción *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XbaI* y *BamHI*. Como sonda se utilizó el fragmento “ddb2”, obtenido mediante PCR y marcado radiactivamente. La Figura 16.2 muestra los resul-

tados obtenidos. Cuando se aplicaron condiciones de hibridación restrictivas se detectó una única banda de hibridación y, por lo tanto, un único fragmento de DNA, en cada una de las carreras correspondientes a cada una de las digestiones consideradas. Estas observaciones indican que la sonda “ddB2” detecta una secuencia (gen) de copia única en el genoma de *B. cinerea*. El gen Bde2 es, por lo tanto, un gen de copia única en el genoma de *B. cinerea*.

16.3. Estrategia de clonación y secuenciación del gen Bde2.

La secuencia del fragmento clonado en el plásmido pddB2-2 había sido determinada previamente (Número de Acceso Z70214) (Benito *et al.*, 1996). Utilizando como sonda el fragmento clonado en este plásmido (la misma sonda utilizada en la hibridación sobre un Southern de DNA genómico de *B. cinerea*) se llevaron a cabo experimentos de hibridación con una genoteca de DNA genómico de *B. cinerea* (cepa SAS56) construida en el vector de clonación lambda EMBL3 (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997). La hibridación que se realizó sobre un filtro de nylon al que se habían transferido aproximadamente 5.000 halos de lisis permitió detectar 5 halos positivos que fueron denominados A1, A2, A3, A4, y A5 (Fig. 16.3).

A partir de los halos positivos A1 y A2 se llevó a cabo un escrutinio primario, secundario y terciario para obtener finalmente una halo individual (y representativo de cada halo original) a partir del cual multiplicar y obtener a gran escala DNA de fago portador del fragmento de DNA genómico de *B. cinerea* detectado con la sonda derivada del fragmento ddB2. La Figura 16.4 muestra un análisis Southern de diferentes digestiones de DNA de los fagos A1 y A2 digeridos con las enzimas de restricción *SalI*, *EcoRI* y *SalI-EcoRI* simultáneamente.

Ambos fagos muestran el mismo patrón de hibridación con las enzimas utilizadas. Decidimos utilizar en los experimentos posteriores de clonación DNA de uno de ellos, el fago A1. Se clonó inicialmente el fragmento *SalI-SalI* de aproxima-

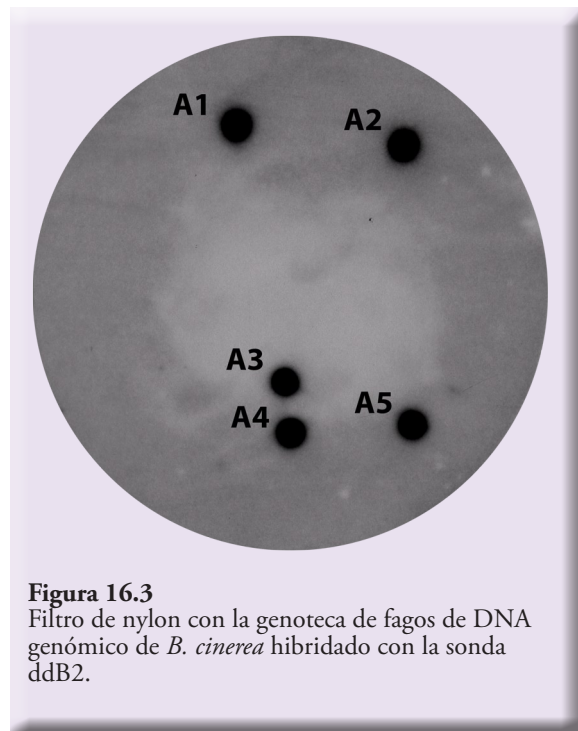


Figura 16.3
Filtro de nylon con la genoteca de fagos de DNA genómico de *B. cinerea* hibridado con la sonda ddB2.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

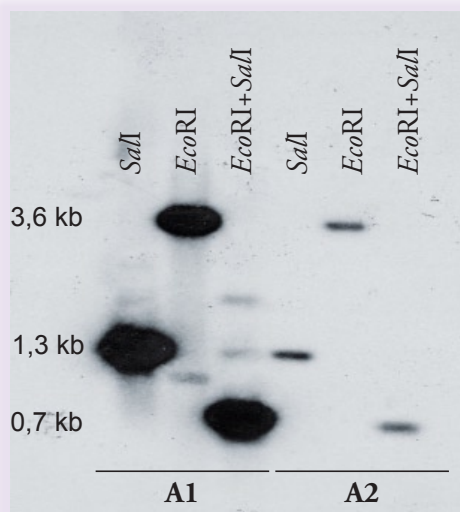


Fig. 16.4
Hibridación Southern de un filtro con DNA de los fagos A1 y A2 digerido con las enzimas *SalI*, *EcoRI* y *SalI+EcoRI* y marcado con la sonda ddb2.

damente 1,3 kb en pBluescriptSK dando lugar al plásmido p2-1 (ver Figura 16.5.A).

Se subclonaron entonces los fragmentos *SalI-EcoRI* de 0,7 kb y *EcoRI-SalI* de 0,6 kb derivados del inserto clonado en el plásmido p2-1, dando lugar a los p2-2 y p2-3, respectivamente. Se purificaron entonces los insertos clonados en estos dos plásmidos y con los mismos se llevaron a cabo hibridaciones Southern sobre nuevas digestiones de DNA del fago A1, en este caso digestiones *PstI*, *EcoRI*, *EcoRI-BamHI* y *BamHI* (Fig. 16.6).

Con la información derivada del análisis de restricción y de hibridación se generó el mapa de restricción que se presenta en la Figura 16.5.B. Se subclonaron entonces en pBluescriptSK el fragmento *EcoRI-EcoRI* de aproximadamente 3,6 kb detectado con la sonda derivada del inserto clonado en el plásmido p2-2 y el fragmento *EcoRI-EcoRI* de aproximadamente 1 kb detectado con la sonda derivada del inserto clonado en el plásmido p2-3, originando los plásmidos p2-5A y p2-6, respectivamente. Se clonó también el fragmento *PstI-PstI* de aproximadamente 4,1 kb detectado con ambas sondas, dando lugar al plásmido p2-7.

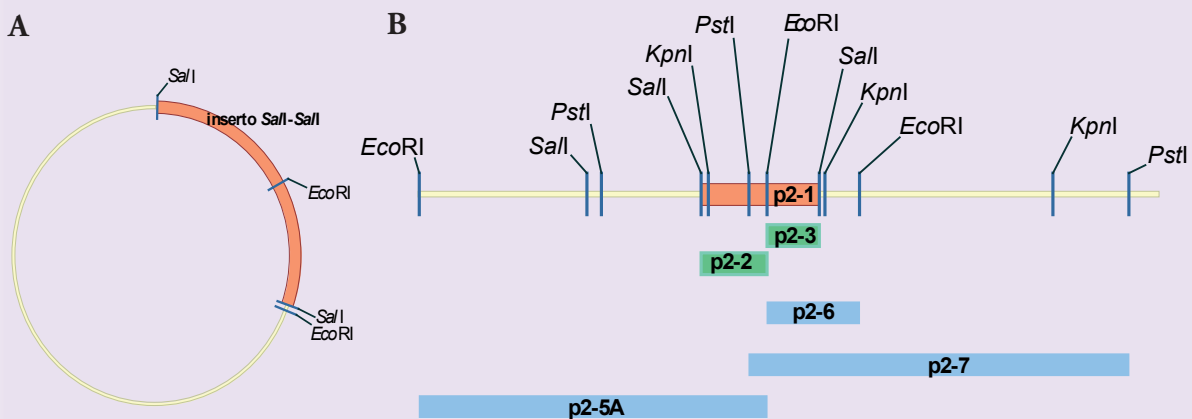
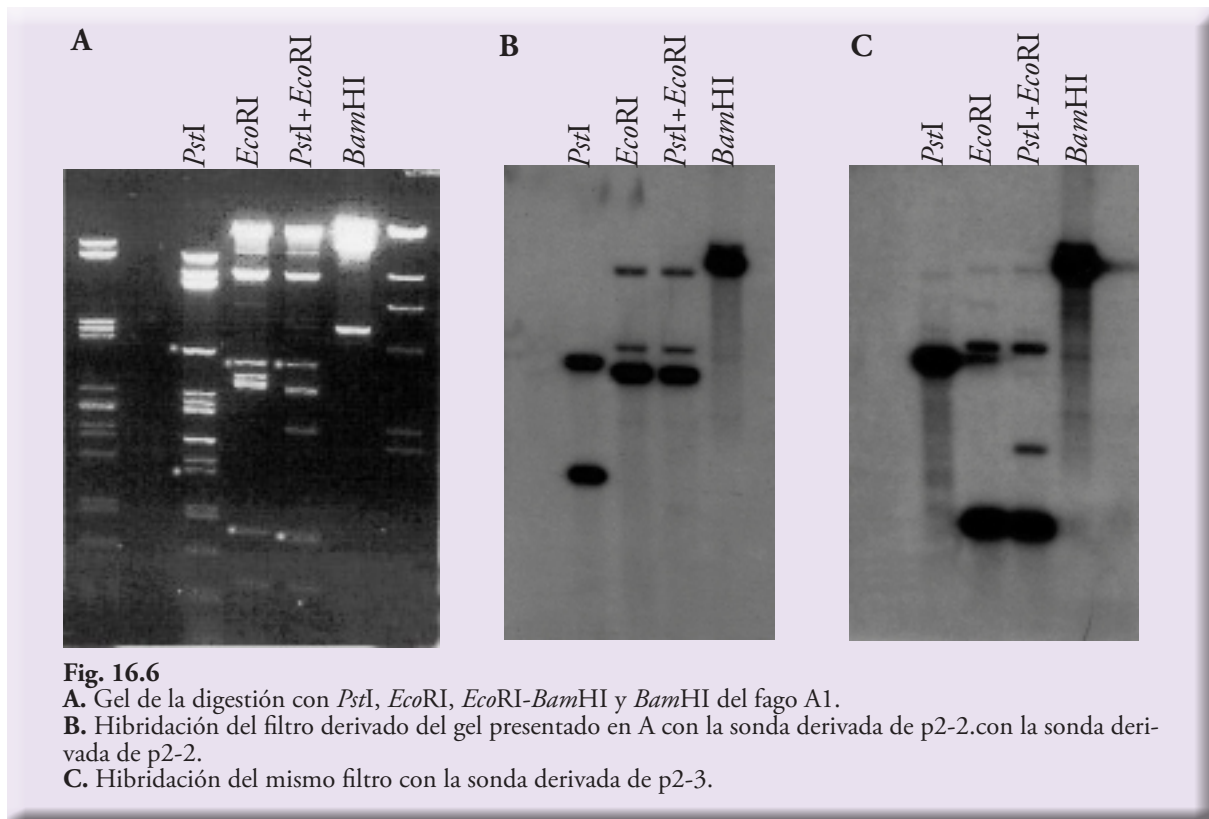


Fig. 16.5
A. Esquema del plásmido p2-1, con el inserto *SalI-SalI* de 1,3 kb.
B. Esquema del mapa de restricción de la región alrededor del fragmento *SalI-SalI* de aprox. 1,3 kb y de los fragmentos clonados en distintos plásmidos derivados y utilizados en la secuenciación de la copia genómica del gen Bde2 (plásmidos p2-2, p2-3, p2-5A, p2-6 y p2-7).



16.4. Secuencia del gen Bde2

La secuenciación de los insertos completos clonados en los plásmidos p2-2, p2-3 y p2-6 utilizando los oligonucleótidos universal y reversos y de regiones parciales de los insertos clonados en los plásmidos p2-5A y p2-7 utilizando oligonucleótidos de secuencia específica diseñados sobre regiones previamente secuenciadas nos permitió secuenciar la región donde se debía ubicar la copia genómica del gen Bde2. La figura 16.7 muestra un esquema simplificado de una región de 2.600 nucleótidos del genoma de *B. cinerea* que incluye la secuencia detectada mediante hibridación con la sonda ddb-2 y las regiones flanqueantes de aquélla. Sobre esta secuencia (Bde2 GMD) se ha realizado un anillamiento con la secuencia del fragmento ddB2.

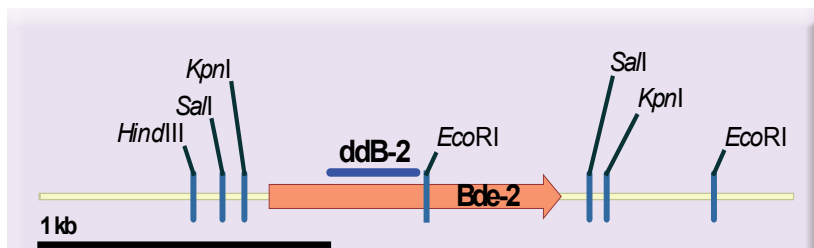


Fig. 16.7
 Región genómica de *B. cinerea* que incluye la zona detectada por la sonda ddb-2.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Como se comprueba en la Figura 16.8, la región en el genoma de *B. cinerea* en la que alinea el fragmento ddB2 queda incluida dentro de un fragmento *SalI-SalI* de 1.277 nucleótidos, el fragmento clonado en el plásmido p2-1 (cuya tamaño se había estimado en 1,3 kb).

El análisis del alineamiento local (Fig. 16.8) muestra que en el extremo 5' del fragmento ddB2 (orientación dada en relación a la polaridad del mensajero del que deriva) encontramos, aunque con variaciones, la secuencia correspondiente al oligonucleótido de 10 nt denominado P2 (5'-TGCATTGGTC-3') que junto con el oligonucleótido reverso denominado RT2 (5'-TTTTTTTTTTTGC-3') permitieron en la reacción de PCR original detectar mediante "differential display" este fragmento de cDNA (secuencias descritas en Benito *et al.*, 1996). Se comprueba que el decámero ha anillado con una posible diana de reconocimiento, detectándose en este caso cuatro diferencias (sustituciones) en relación con la secuencia diana auténtica, tres de las cuales afectan a nucleótidos correspondientes al extremo 5' del oligonucleótido y una al extremo 3' (una sustitución en la posición 8 del oligonucleótido). En el extremo 3' del fragmento ddB2 encontramos una cola polyA de 11 nucleótidos precedida de los nucleótidos GC, que corresponde a la secuencia del primer reverso RT2 utilizado originalmente.



Fig. 16.8 Esquema de la secuencia de la región del genoma de *B. cinerea* que incluye el gen *Bde2* y anillamiento de la misma con la secuencia del fragmento ddB2. En verde se representa la posición y orientación del gen y en amarillo se presentan los exones identificados de su región estructural.

El estudio de este alineamiento de la región que incluye la copia genómica del gen Bde2 con la región de cDNA correspondiente en el fragmento ddB2 permitió detectar, además, la presencia y localización de un intrón en el gen Bde2 (ver Fig. 16.9).

Se procedió entonces a analizar detalladamente la secuencia alrededor de la región con homología con el fragmento ddB2. Se detectó una posible fase de lectura abierta interrumpida por una segunda secuencia de tipo intrón localizada aguas arriba del intrón previamente descrito y que discurriría de izquierda a derecha en el esquema presentado en la Figura 16.8, identificándose varios posibles codones de iniciación alrededor de la posición número 700 (numeración según esquema de la Figura 16.8) y varios posibles codones de terminación alrededor de la posición 2.120 (esta fase de lectura está representada mediante cajas de color amarillo en la Figura 16.8 y el gen correspondiente, el gen Bde2, mediante una flecha gruesa de color verde). Se comprobó en una análisis preliminar de la posible secuencia de aminoácidos codificada por esta fase abierta de lectura que el gen Bde2 codificaría una proteína con homología con ciclinas.

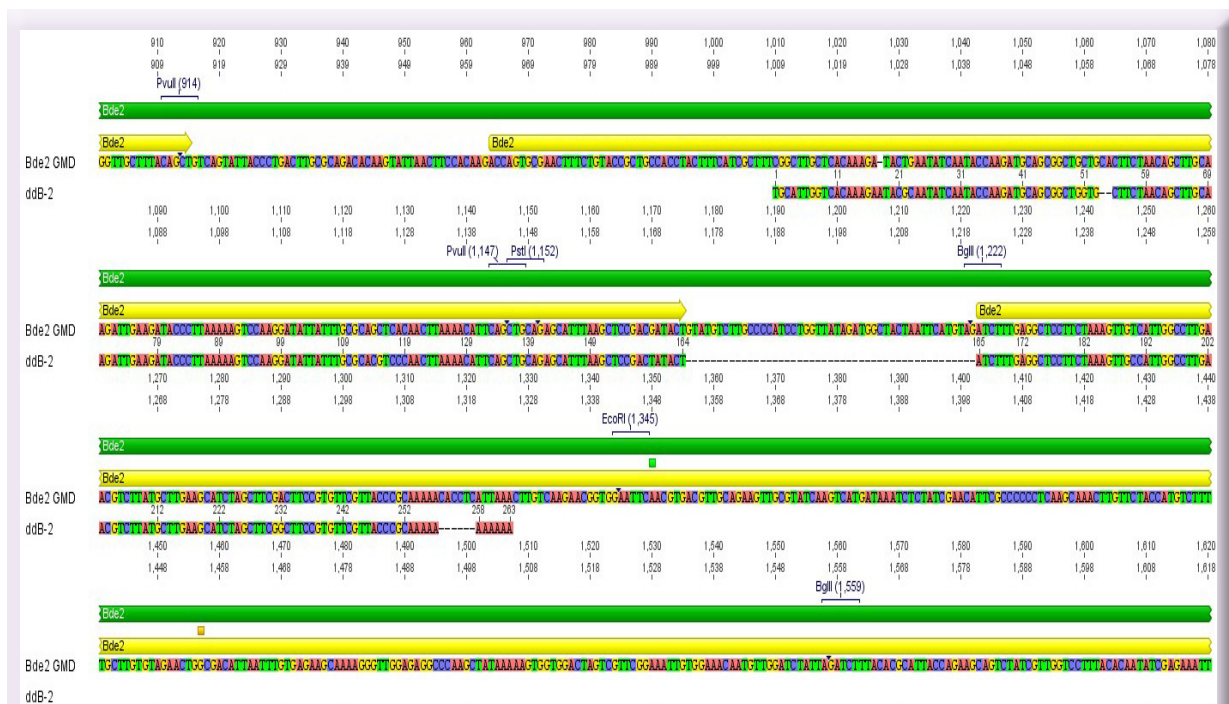


Fig. 16.9 Detalle del alineamiento local de la secuencia de la copia genómica del gen Bde2 y de la secuencia del fragmento ddB2. En verde se representa la posición y orientación del gen y en amarillo se presentan los exones identificados de su región estructural.

Durante la realización de este análisis se hizo pública la secuencia del genoma de dos cepas de *B. cinerea*, la cepa B05.10 y la cepa T4, y de una cepa de la especie relacionada *S. sclerotiorum*,

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

como hemos indicado en secciones anteriores de esta memoria. Fue posible entonces analizar la información obtenida en el curso del proyecto de secuenciación de los tres genomas y las anotaciones automáticas realizadas en nuestra región de interés. Fue posible comprobar en primer lugar que en los tres genomas existe una única copia del gen codificador del mRNA a partir del cual se ha generado el fragmento de cDNA ddB2, confirmando los resultados obtenidos en nuestro caso mediante experimentos de hibridación Southern en *B. cinerea* B05.10.

En los tres organismos se identifica un gen homólogo de nuestro gen Bde2 que ha recibido el siguiente código en cada caso:

B. cinerea B05.10: BC1G_03046.1

B. cinerea T4: BofuT4_P002710.1

S. sclerotiorum: SS1G_07559.1

Se estudió la anotación automática propuesta de cada uno de los tres genes, considerando en cada caso la secuencia de la copia genómica y de la copia cDNA derivada del análisis automático. Se buscaron, además, posibles secuencias de EST descritas en cualquiera de los sistemas que pudieran facilitar la identificación de intrones. Sólo en el caso de *B. cinerea* T4 se encontraron dos secuencias solapantes de dos EST derivados de una genoteca de cDNA construida a partir de micelio cultivado durante cuatro días en medio rico (Contig EST Name: bt4ctg_0035_CL_bt4ctg_0035_002.Contig1_v5). En *B. cinerea* B05.10 y en *S. sclerotiorum* hasta el momento no se ha detectado expresión del gen analizado. Con las secuencias de las copias genómica y cDNA de los tres genes propuestas en la anotación automática, la secuencia del gen Bde2 determinada manualmente en el curso de este trabajo, la secuencia del fragmento ddB2 y la secuencia de los dos EST identificados en las bases de datos y derivados del gen BofuT4_P002710.1 se llevó a cabo un alineamiento cuyo resultado se presenta en la Figura 16.10.

El estudio de este alineamiento nos proporciona varias claves para identificar y proponer con muchas garantías cuál es la secuencia y la estructura del gen Bde2. En primer lugar, las anotaciones automáticas de los tres genes, identifican el segundo intrón que nuestro análisis preliminar permitió detectar y sobre el cual disponemos de evidencias experimentales directas puesto que está ubicado en la zona correspondiente al fragmento de cDNA ddB2 (alrededor de la posición 1200 en la secuencia Bde2 GMD en la Figura 16.10 – ver caja I en la Figura). También las anotaciones automáticas de los tres genomas identifican un primer exón aguas arriba del anterior, en torno a la posición 950 de la secuencia Bde2 GMD (ver caja II en la Figura 16.10). Dado que es identificado en los tres casos y que la secuencia del intrón propuesto está flanqueada por secuencias consenso de intrones en ambos



Fig. 16.10

Anillamiento de las secuencias de las copias genómica y cDNA de los genes ortólogos de Bde2 identificados en el curso de la anotación automática de los genomas de *B. cinerea* B05.10 (gen BC1G_03046.1), *B. cinerea* T4 (gen BofuT4_P002710.1) y *S. sclerotiorum* (SS1G_07559.1). Se ha incluido también la secuencia del fragmento ddb2, la secuencia del único EST identificado en las bases de datos derivadas de genotecas de cDNA utilizadas en los proyectos de secuenciación de los tres genomas (BofuT4 EST) y la secuencia determinada manualmente en el curso de este trabajo (Bde2 GMD).

extremos en los tres sistemas, asumimos que este intrón es cierto. Por otra parte, la anotación del gen BofuT4_P002710.1 en la cepa T4 de *B. cinerea* propone un tercer intrón en torno a las posiciones correspondientes a las posiciones 1.600-1.650 de la secuencia de Bde2 GMD. Este intrón no es identificado en la anotación del gen BC1G_03046.1 de la cepa B05.10 ni en la anotación del gen SS1G_07559.1 de *S. sclerotiorum*. Por otra parte, la única secuencia EST descrita derivada de uno de estos tres genes, concretamente del gen BofuT4_P002710.1 de la cepa T4, corresponde a la región terminal del supuesto mRNA y cubre la zona donde se ubicaría este intrón. En esa secuencia cDNA está presente la secuencia de nucleótidos que debería haber sido procesada durante la maduración del mRNA codificado si se tratara efectivamente de un intrón. Descartamos, por lo tanto, este tercer intrón que atribuimos a un modelo de gen erróneo propuesto en el curso de la anotación automática (ver caja III en la Fig. 16.10). Asimismo, la anotación automática del gen SS1G_07559.1 de *S. sclerotiorum* propone un intrón adicional.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

La secuencia de la región terminal del cDNA propuesto como derivado del gen BC1G_03046.1 en la anotación automática presenta diferencias muy notables en relación con la secuencia de la copia genómica del mismo y con las secuencias tanto de la copia genómica como cDNA de los genes analizados en T4 y en *S. sclerotiorum* (Caja IV en la Figura 16.10). El alineamiento es muy pobre porque en este caso la anotación automática propone una organización de exones e intrones en la región terminal del gen muy distinta a la propuesta en los otros genes y, como consecuencia de ellos, las regiones alineadas no se corresponden. Dado que la organización propuesta es muy similar en los genes BofuT4_P002710.1 y SS1G_07559.1, asumimos como correcta la organización propuesta en estos genes que, además, responde a la información derivada de la secuencia del EST BofuT4EST.

Debemos destacar que en la región terminal del gen SS1G_07559.1 observamos una pequeña delección de 24 nucleótidos que parece ser específica de este gen en este organismo (ver Caja V en la Fig. 16.10.).

Finalmente, el análisis del alineamiento llevado a cabo nos permite identificar la posición de los codones de iniciación y terminación de la traducción que probablemente son correctos. En la región del gen de B05.10 determinada en el curso de nuestro trabajo (secuencia Bde2 en la Figura 16.10) hemos identificado varios codones de iniciación que se encuentran en la misma fase de lectura, aunque sólo dos presentan las características que Nakagawa y colaboradores han descrito. Nakagawa y colaboradores han observado que, aunque existen variaciones dependiendo de los grupos de eucariotas considerados, existe un sesgo muy importante en todos los casos por la presencia de A/G en la posición -3, A/C en la posición -2 y C en la posición +5 (el residuo A del codón AUG está numerado como +1) (Nakagawa *et al.*, 2008). En nuestro caso tenemos dos codones de iniciación, muy cercanos entre sí, que pueden ser tomados como candidatos. La comparación con las propuestas que realiza la anotación automática sugiere que el codón de iniciación válido es uno de los dos localizados en torno a la posición 700 de la secuencia Bde2 GMD, lo que refuerza la aproximación realizada antes. En el gen BC1G_03046.1 se propone un codón de iniciación posterior que determinaría que la proteína codificada fuera de menor tamaño. En los genes BofuT4_P002710.1 y SS1G_07559.1 se proponen los codones correspondientes a los propuestos en nuestro trabajo y, aunque no disponemos de evidencias experimentales directas que nos permitan determinar cuál es el válido, teniendo en cuenta la homología de la proteína deducida con otras secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos y la proximidad de los mismos, proponemos como válido el primero de ellos localizado en la posición 704 de la secuencia Bde2 GMD) (ver línea A en la Figura 16.10). En cuanto al posible codón de terminación, teniendo en cuenta los problemas descritos en relación con la

anotación automática del gen BC1G_03046.1, los datos derivados de la anotación de los genes BofuT4_P002710.1 y SS1G_07559.1 y la secuencia del EST derivado del gen BofuT4_P002710.1 proponemos como codón de terminación el localizado en la posición 2.134 de la secuencias Bde2 GMD (ver línea B de la Figura 16.10).

La secuencia definitiva del gen Bde2 determinada en curso de este trabajo y de sus secuencias flanqueantes, así como la organización del mismo y la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida se presentan en la Figura 16.11.



Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

```
+601 ACCCGCAAAAACACCTCATTAAACTTGTCAAGAACGGTGGAAATTCAACGT
    Y P Q K H L I K L V K N G G I Q R
+651 GACGTTGCAGAAGTTGCGTATCAAGTCATGATAAATCTCTATCGAACATT
    D V A E V A Y Q V M I N L Y R T F
+701 CGCCCCCTCAAGCAAACCTTGTCTACCATGTCTTTTGTGTGTAGAAC
    A P L K Q T C S T M S F A C V E
+751 TGGCGACATTAATTTGTGAGAAGCAAAAGGGTTGGAGAGGCCCAAGCTAT
    L A T L I C E K Q K G W R G P S Y
+801 AAAAAGTGGTGGACTAGTCGTTTCGGAAATTGTGGAAACAATGTTGGATCT
    K K W W T S R S E I V E T M L D L
+851 ATTAGATCTTTACACGCATTACCAGAAGCAGTCTATCGTTGGTCTTTTAC
    L D L Y T H Y Q K Q S I V G P L
+901 ACAATATCGAGAAATTCATAGGTATCCGAATTAAGATCAATCAAGAGCTG
    H N I E K F I G I R I K I N Q E L
+951 GAGGAGAAGAGATTACCAAGACACACGGAACACCACGAAGCACCACGAAA
    E E K R L P R H T E H H E A P R N
+1001 TAATGGGGTGCACACCCTCCCAACACTCCTGTTACACCAGCCAGCCCAG
    N G V R H P P N T P V T P A S P
+1051 CAGACTTACGATTTAATGGCCATGTTGCATCACCAGCAAACCAGAGCCCC
    A D L R F N G H V A S P A N Q S P
+1101 AAATCGGTAAGTTCAGGTTTCGAAACCACCCACGGGTATTCGTGGTCAGAG
    K S V S S G S K P P T G I R G Q S
+1151 TGGTACGGTACGTTATATGTTGGATGTGGTTACAGCCAAGAATGAGAGAG
    G T V R Y M L D V V T A K N E R
+1201 ACATAGTCGACACATACTTTCAAGATGAATATGAGGGATATGAAGTGGAA
    D I V D T Y F Q D E Y E G Y E V E
+1251 GTAGAAGAGGCGGTACCTGTTGAACCAATACCCACCCACCATACTCCGAG
    V E E A V P V E P I P T H H T P R
+1301 AGAACCACATCATGGACGACATCATGGGCATGGACACGGACACGGACACG
    E P H H G R H H G H G H G H G H
+1351 GGCATGGGCATGGGCATGGGCATGGACATGGACGAGATTATCGACACTTT
    G H G H G H G H G H G R D Y R H F
+1401 AACAAACGAATGCGAAGATGA
    N K R M R R -
+1422 TGAAAATCCCAAATCAACTCATTATCAGAGAATCTAGTACGGCGTTTGG
+1472 TTACGGGGGGGAGGGTATCTTCAAAGATCAATGCATAATAGGAGTCT
+1522 TAAGGATGCTTCATGGGAGGTTTTGGGAGTTATCGGGAGCGAAAAGGAAG
+1572 ATACCAACTTATTATATATAGTAGGTAGATGTATATTTAAAAGAGCAATA
+1622 AGGAACCAACGACTGTAGAATTCTATCATAACTTCATTGAATGACTAATG
+1672 ATGGATCTGGGTTTTTCATACAGTTAAAGTTCCAGTTATAGTTACGATTG

+1722 TAGCGATTGTTATGATGACTATTGAAGACAAATAAATGAATAAATTAATT
+1772 ATTGACTTTTCACTGATTGACTATATGGTTTACCTAGTATGTTAG
```

Figura 16.11

Secuencia de nucleótidos perteneciente a la región genómica que contiene al gen Bde2.

Como se observa, la región estructural del gen Bde2 consta de tres exones de 212, de 211 y de 900 nucleótidos, respectivamente, separados por dos intrones de 48 y 47 nucleótidos, respectivamente, localizados entre las posiciones 199-260 el primero de ellos y 473-518, el segundo. El pro-

cesamiento de estos intrones determina una fase de lectura de 1.326 nucleótidos, incluido el codón de terminación, que codifica una proteína deducida de 441 aminoácidos.

16.5. Análisis de la región promotora

La secuencia promotora del gen *Bde2* presenta cajas TATA (posiciones -669 a -666 y -550 a 551) y CAAT (posiciones -2 a +2, -13 a -10, -20 a -17) implicadas en el control de la transcripción en organismos eucarióticos de forma general. Un análisis de motivos de unión de posible factores reguladores específicos en la región promotora utilizando el programa MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005) permite identificar, además, los motivos que se presentan en la tabla 16.I. Los resultados de las familias de factores de transcripción localizadas se muestran en la tabla 16.I.

Familia	Localización	Ratio	Secuencia
RNA polymerase II transcription factor II B	-1294 (-)	1.000	ccgCGCC
Yeast mating factors	-1135 (-)	0.977	tcATGTagatg
Yeast activator of glycolytic genes	-948 (-)	0.933	ctCTTCaagtatttcc
<i>Aspergillus/Neurospora</i> -activ. of genes induced by Nitrogen	-825 (-)	0.994	TATCtcg
<i>Aspergillus</i> spore/developmental regulator	-679 (-)	0.937	atatatCATTccatc
Core promoter initiator elements	-678 (-)	0.942	taTCATtccat
Pheromone response elements	-650 (-)	0.965	agctgaAACAagc
Metal regulatory element factors	-648 (+)	0.937	ttgttcaGCTGagg
Yeast activator of glycolytic genes	-645 (-)	0.927	atCTTCctcagctgaaa
TR-Box interaction	-630 (+)	0.860	agatgtCCTTgttgatgctc
Yeast activator of glycolytic genes	-617 (-)	0.831	caacttcaGCCGggaca
Vertebrate TATA binding protein factor	-564 (-)	0.938	tactaTAAAgcggcttt
Yeast activator of glycolytic genes	-537 (+)	0.814	ta catttACCGatggtt
Yeast activator of glycolytic genes	-518 (+)	0.927	atCTTCctctgtgcggc
Yeast GAL4 factor	-388 (-)	0.773	ctgCGGCattcaataatacgaggtt
Fungal GATA binding factors	-230 (-)	0.896	gcGATAatctg
<i>Aspergillus</i> cell pattern formation	-225 (+)	0.972	tatCGCGagtt
General transcription factor IID, GTF2D	-136 (+)	0.695	aaatccaaggcaaacctacaccagagactGACGggaag
Core promoter motif ten elements	-101 (+)	0.883	gaAGCCgaacgtagatgcgag
Yeast stress response elements	-79 (-)	0.980	caAGGGggc
Fungal GATA binding factors	-28 (-)	0.895	ttGATAaagta
<i>Aspergillus/Neurospora</i> -activ. of genes induced by Nitrogen	-23 (+)	0.994	TATCaat

Tabla 16.I.

Resultados obtenidos con el MatInspector al buscar dominios de unión en la región promotora. Los primeros cuatro motivos se localizan en posiciones no incluidas en la secuencia que se presenta en la Figura 16.11

16.6. La región 3' flanqueante

El análisis de la región 3' flanqueante mostró dos secuencias consenso de señal de poliadenilación, AATAAA, la cual se presenta en la mayoría de los genes de organismos eucariotas (Proudfoot y Brownlee, 1976), localizadas en el gen Bde2 entre las posiciones 1751-1756, la primera de ellas y 1759-1764, la segunda de ellas. Cabe reseñar que las dos secuencias se encuentran muy próximas entre sí.

16.7. La proteína deducida

La fase abierta de lectura del gen Bde2 codifica una proteína deducida de 441 aminoácidos, un peso molecular de 49.950,8 y un punto isoeléctrico teórico de 9,03. En la tabla 16.II se puede ver la composición aminoacídica de la proteína.

Aminoácido	cantidad	%	Aminoácido	cantidad	%
Ala (A)	32	7,3 %	Leu (L)	28	6,4 %
Arg (R)	29	6,7 %	Lys (K)	25	5,7%
Asn (N)	15	3,4 %	Met (M)	109	2,1%
Asp (D)	18	4,1 %	Phe (F)	15	3,4%
Cys (C)	6	1,4 %	Pro (P)	30	6,9 %
Gln (Q)	20	4,6 %	Ser (S)	22	5,0 %
Glu (E)	28	6,4 %	Thr (T)	28	6,4 %
Gly (G)	28	6,4 %	Trp (W)	4	0,9 %
His (H)	31	7,1 %	Tyr (Y)	15	3,4 %
Ile (I)	24	5,5 %	Val (V)	29	6,7 %

Tabla 16.II

Resumen de la composición de aminoácidos de la proteína codificada por el gen Bde2.

Se analizó, utilizando diversas herramientas bioinformáticas, la secuencia deducida de la proteína codificada por el gen Bde2 para determinar la presencia o no en la misma de posibles dominios funcionales que pudieran proporcionar información sobre la función de la proteína. Así, en primer lugar se envió la secuencia deducida para su comparación con la base de datos InterProScan a través del servidor ExPASy. Los resultados generados indicaron una elevada homología con el dominio PTHR10026 (Evalor: $3.8e-81$) y, ya en menor medida, con otros dominios funcionales o motivos descritos en proteínas de tipo ciclina y depositados en diferentes bases de datos (ver Tabla 16.III). El

motivo PTHR10026 forma también parte del dominio InterPro IPR015429, característico de ciclinas implicadas en regulación de la transcripción. La presencia de estos motivos permitió denominar la proteína derivada del gen Bde2 como *Botrytis cinerea* Transcription-related Cyclin 1 (BCTC1)

Base de datos	Dominio	Descripción	Pos. In.	Pos. Fin.	E-value	IPR Dominio	
HMMPanther	PTHR10026	CYCLIN	54	406	3.8e-81	IPR015429	Transcrip. regulador cyclin
HMMSmart	SM00385	CYCLIN	60	159	4.6e-11	IPR006670	Cyclin
HMM Pfam	PF00134	Cyclin_N	59	166	9e-06	IPR006671	Cyclin, N-terminal
superfamily	SSF47954	Cyclin-like	9	167	2.2e-27	IPR011028	Cyclin-like
superfamily	SSF47954	Cyclin-like	166	261	0.02	IPR011028	Cyclin-like
Gene3D	G3DSA:1.10.472.10	no description	26	182	1.1e-12	IPR013763	Cyclin-related

Tabla 16.III
Comparación de posibles dominios funcionales en diversas bases de datos.

Cuando se analiza la secuencia de interés a través del servidor del NCBI tratando igualmente de identificar dominios funcionales conservados en la proteína es posible identificar una región de homología con tres dominios funcionales que presentan motivos conservados característicos de ciclinas. El programa CDD del NCBI detecta la existencia de un dominio denominado “Cyclin box fold” (Cd00043), dominio de unión a proteína que actúa en el ciclo celular y control de transcripción, localizado entre las posiciones de aminoácidos 50 y 131, un dominio “ciclina” (Smart000385) presente en ciclinas, TFIIB y retinoblastomas entre las posiciones 60 y 131, y un dominio CCL1 (COG5333) localizado entre las posiciones, 55 y 236 de la proteína BCTC1. Es este tercer dominio, COG5333, aquél con el que se detecta una mayor homología (e-valor de $5e-12$). Se trata de un dominio que está presente en kinasas activadoras de Cdks (CAK), en factores de iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa II y en factores de reparación por escisión de nucleótidos (TFIIH/TFIIK), actuando así en control de división celular y separación de cromosomas, en control de transcripción, en replicación de DNA, recombinación y reparación.

El análisis bioinformático de la secuencia proteica deducida mediante diversas herramientas como WoLFPSORT, pSORT, TMPred o PredictProtein, nos indica que la proteína carece de péptido señal y de señal de localización mitocondrial y que no posee dominios transmembrana (por lo que no debe estar anclada a ningún orgánulo subcelular).

Teniendo en cuenta la información derivada del análisis bioinformático llevado a cabo es posible proponer que BCTC1 es una proteína de tipo ciclina, quizás una ciclina relacionada con la regulación de la transcripción (dado que se identifica la región de homología con el dominio IPR015249 en la secuencia deducida). Decidimos entonces profundizar en la caracterización bioin-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

formática de la misma tratando de identificar secuencias homólogas previamente descritas mediante el uso de BLASTP a través del servidor del NCBI. La Tabla 16.IV muestra los resultados obtenidos.

Secuencias que presentan un alineamiento significativo		Score	E valor
ref XP_001590935.1	hypothetical protein SS1G_07559 [<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980]	707	0.0
ref XP_001558382.1	hypothetical protein BC1G_03046 [<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10]	612	5e-173
gb EEH03756.1	C-type cyclin [<i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR]	356	4e-96
gb EEH38574.1	C-type cyclin [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01]	352	7e-95
ref XP_750450.1	cyclin [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]	348	1e-93
gb EEQ71727.1	cyclin [<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081]	347	2e-93
gb EDP56037.1	cyclin, putative [<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163]	347	3e-93
ref XP_001264964.1	cyclin, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	345	8e-93
ref XP_001269458.1	cyclin, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	338	1e-90
gb EED15036.1	cyclin, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	334	2e-89
gb EEQ32541.1	C-type cyclin [<i>Microsporium canis</i> CBS 113480]	330	4e-88
ref XP_002149202.1	cyclin, putative [<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224]	328	1e-87
emb CAP98454.1	Pc22g11660 [<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255]	325	1e-86
ref XP_001935256.1	C-type cyclin [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP]	321	2e-85
gb EEH45919.1	C-type cyclin [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18]	280	4e-73
gb ABK27196.1	C-type cyclin [<i>Epichloe festucae</i>]	256	8e-66
ref XP_002173275.1	cyclin Ctk2 [<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275]	150	2e-34
sp O59748.1	CTK2_SCHPO cyclin Ctk2 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	128	8e-29
ref XP_002200602.1	PREDICTED: cyclin K [<i>Taeniopygia guttata</i>]	95.5	7e-18
ref XP_855304.1	PREDICTED: similar to cyclin K [<i>Canis familiaris</i>]	95.1	1e-17
ref XP_001925553.1	PREDICTED: similar to cyclin K [<i>Sus scrofa</i>]	94.7	1e-17
ref NP_001092872.1	cyclin K isoform 1 [<i>Homo sapiens</i>]	94.4	1e-17
ref NP_033962.2	cyclin K [<i>Mus musculus</i>]	94.4	1e-17
ref XP_609221.4	PREDICTED: similar to cyclin K [<i>Bos taurus</i>]	94.4	2e-17
ref XP_001476561.1	PREDICTED: similar to cyclin K [<i>Mus musculus</i>]	94.4	2e-17
ref NP_001072323.1	cyclin K [<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>]	94.0	2e-17
ref NP_001026380.1	cyclin K [<i>Gallus gallus</i>]	94.0	2e-17
ref NP_001103142.1	cyclin K [<i>Rattus norvegicus</i>]	94.0	2e-17
sp O75909.2	CCNK_HUMAN cyclin K [<i>Homo sapiens</i>]	94.4	1e-18
ref XP_001515372.1	PREDICTED: similar to cyclin K, partial [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>]	92.4	6e-17
sp O88874.2	CCNK_MOUSE cyclin K [<i>Mus musculus</i>]	92.0	7e-18
ref NP_003849.2	cyclin K isoform 2 [<i>Homo sapiens</i>]	92.0	7e-17
pdb 2I53 A	Chain A, Crystal Structure Of Cyclin K	89.7	2e-18
ref XP_697908.2	PREDICTED: cyclin K [<i>Danio rerio</i>]	86.3	4e-15
ref XP_001195649.1	PREDICTED: similar to Cyclin K [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	85.9	6e-15

Tabla 16.IV

Resultados obtenidos en diversas bases de datos utilizando el algoritmo pBLAST cuando se analiza la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen Bde2, tratando de identificar secuencias homólogas.

Las homologías más elevadas, con un e-valor de $1e-100/1e-60$, corresponden a proteínas ciclinas de tipo C de hongos. En todos los casos son proteínas anotadas derivadas de proyectos de secuenciación de genomas completos de hongos. La información sobre su posible estructura y función ha sido generada también mediante análisis bioinformático y en ninguna de las secuencias detectadas se encuentran referencias a evidencias experimentales directas sobre la actividad de las mismas. Todas ellas incluyen la región de homología correspondiente al dominio CCL1 identificado en nuestro análisis de dominios conservados de la proteína codificada por el gen Bde2. Con niveles de homología inferiores (e-valor de aproximadamente $1e-30$) se detectan dos proteínas de tipo CTK de *S. pombe* y *S. japonicus* y con niveles de homología aún inferiores (e-values entre $1e-20$ y $1e-10$) se identifican proteínas de tipo ciclina K de distintas especies de eucariotas superiores. En estos dos últimos casos sí se dispone de evidencias experimentales directas de la actividad de este tipo de ciclinas. La subunidad ctk2 forma parte del complejo CTDK-I de *S. pombe*. Constituye la subunidad ciclina de este complejo, el cual hiperfosforila el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA pol II, modulando así su actividad. Está implicado el complejo en la regulación de la transcripción (elongación) y en el procesamiento del extremo 3' del RNA mensajero (Karagiannis and Balasubramanian, 2007). La ciclina K en humanos está asociada a la RNA pol II y posee actividad kinasa activadora de kinasas dependientes de ciclina y actividad kinasa carboxilo-terminal que modula la actividad de la RNA pol II (Edwards *et al.*, 1998).

El hecho de que la proteína BCTC1 presente una homología a ciclinas reguladoras de la transcripción, en especial para las familias de ciclinas tipo C y tipo K, nos motivó para buscar motivos específicos de este tipo de proteína que se hubieran caracterizado previamente (Cooper *et al.*, 1997; Kuchin *et al.*, 1995). Uno de estos motivos, "cyclin box fold", ya fue detectado previamente cuando utilizamos el CDD del NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Los motivos PEST, también característicos de estas proteínas, son regiones hidrofílicas de más de 12 aminoácidos con una alta concentración de Prolina, Glutámico, Serina y Treonina. Para encontrar estos motivos utilizamos el algoritmo epestfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) que nos propuso 4 posibles regiones poco relevantes, al no obtener ninguna de ella un valor PEST mayor de 5.0 (valor mínimo para considerar la región de interés biológico). Tampoco se hallaron ningún motivo "destruction box" al buscar manualmente las secuencias RQKL y RXXQX₄L. La figura 16.12 muestra gráficamente la posición de estas características.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

```
1  MAPAPEPTQVIPTGPHPSFIQVAKPYMFQQHVNTKLMIIGANPTREDQFR
51  LQGVTWINDVRVALQLPVRTFCTAATYFHRFRLAHKDTEYQYQDAAAAAL
101  LTACKIEDTLKKSDIICAAHNLKHSAAEHLSSDDTI FEAPSKVVIGLER
151  LMLEASSFDFRVRYPQHLLIKLVKNGGIQRDVAEVAYQVMINLYRTFAPL
201  KQTCSTMSFACVELATLICEKQKGWRGPSYKKWWT SRSEIVETMLDLLDL
251  YTHYQKQSIVGPLHNIEKFIGIRIKINQELEEKRLPRHTEHHEAPRNGV
301  RHPNTPVTPASPADLRFNGHVASSPANQSPKSVSSGSKPPTGIRGQSGTV
351  RYMLDVVTAKNERDIVDTYFQDEYEGYEVEVEEAVPVEPIPTHHTPREPH
401  HGRHHGHGHGHGHGHGHGHGRDYRHFNKRMRR -
```

Figura 16.12

Secuencia proteica de la proteína BCTC1 con los posibles dominios o motivos detectados. Dominio “cyclin box fold” en rojo (Cd00043), dominio CAK en amarillo (CCL1) y motivos PEST (poco relevantes) en verde.

La figura 16.13 muestra un árbol filogenético construido sobre el alineamiento de la secuencia de la proteína Bde2 con secuencias de tipo ciclinas-C y con secuencias de tipo ciclinas-K representativas.

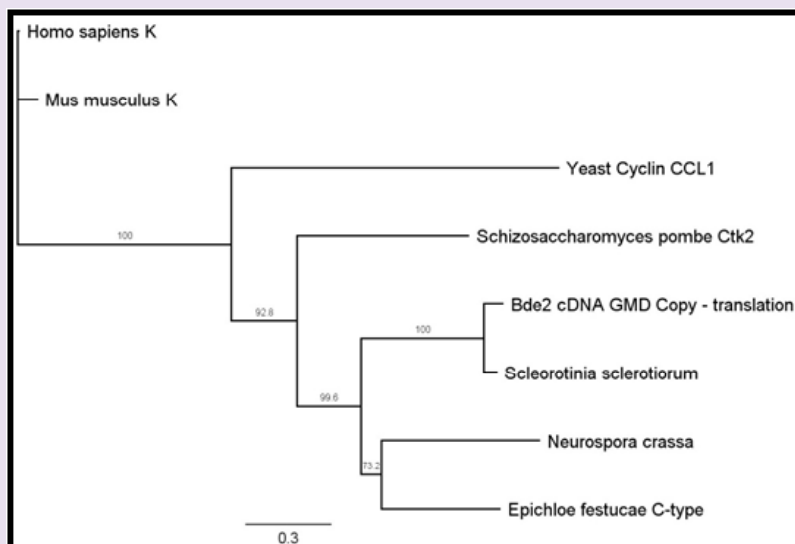


Figura 16.13

Análisis de similitud de secuencias de tipo ciclinas-C y de tipo ciclinas-K representativas y la proteína deducida codificada por el gen Bde2.

17. Análisis funcional del gen Bde2

17.1. Diseño Experimental

Al igual que el gen Bde47A, el gen Bde2 fue aislado en el curso del análisis del patrón de expresión de *B. cinerea* durante su interacción con plantas de tomate en comparación con su patrón de expresión durante su crecimiento saprofito. Este gen parece expresarse diferencialmente *in planta* y en particular durante la fase de formación de lesiones dispersivas y maceración del tejido infectado (Benito *et al.* 1996). Para examinar el papel de este gen en el proceso de infección de *B. cinerea* se ha diseñado una estrategia de obtención de mutantes alterados específicamente en el mismo mediante reemplazamiento génico sobre los que valorar posibles alteraciones en relación con la cepa silvestre en cuanto su capacidad de infección de la planta huésped y en su caso en relación con posibles alteraciones durante el crecimiento saprofito.

17.2. Construcción de los plásmidos utilizados

Para la construcción del vector de transformación pBPC5 se diseñó una estrategia basada en la utilización de fragmentos de DNA flanqueantes del gen diana de tamaño menor o igual a 1 kb, ya que hemos podido comprobar experimentalmente que la utilización de fragmentos de estos tamaños, aunque genera una eficiencia de transformación menor, resulta en una mayor proporción de mutantes por reemplazamiento génico auténticos.

En el plásmido pBPC-5, el fragmento *HindIII-EcoRI*, de 1.809 nucleótidos y que incluye toda la región codificante del gen Bde2 y parte de sus regiones 5' y 3', fue reemplazado por la fusión génica indicada en la Figura 17.1, quedando como secuencias flanqueantes al fragmento reemplazado en el vector construido finalmente un fragmento de 590 nucleótidos en su extremo 5' y un fragmento de 1.031 nucleótidos en su extremo 3'. El plásmido porta como marcador seleccionable el gen bacteriano *hph*, codificador de la enzima higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Para su expresión eficiente en *B. cinerea* el gen *hph* ha sido fusionado al promotor del gen *oliC* de *Aspergillus nidulans* y al terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* (Ward 1991). La fusión resultante, clonada en pUC18, fue cedida amablemente por el Dr. M. Ward (Genecord International, South San Francisco, California).

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Para la construcción del vector de transformación pBPC5 se digirió el plásmido p2-7 con las enzimas de restricción *EcoRI-XhoI* y se purificó la región terminadora del gen como un fragmento de 1.031 pares de nucleótidos. Del plásmido pOHT se extrajo el casete de resistencia a higromicina

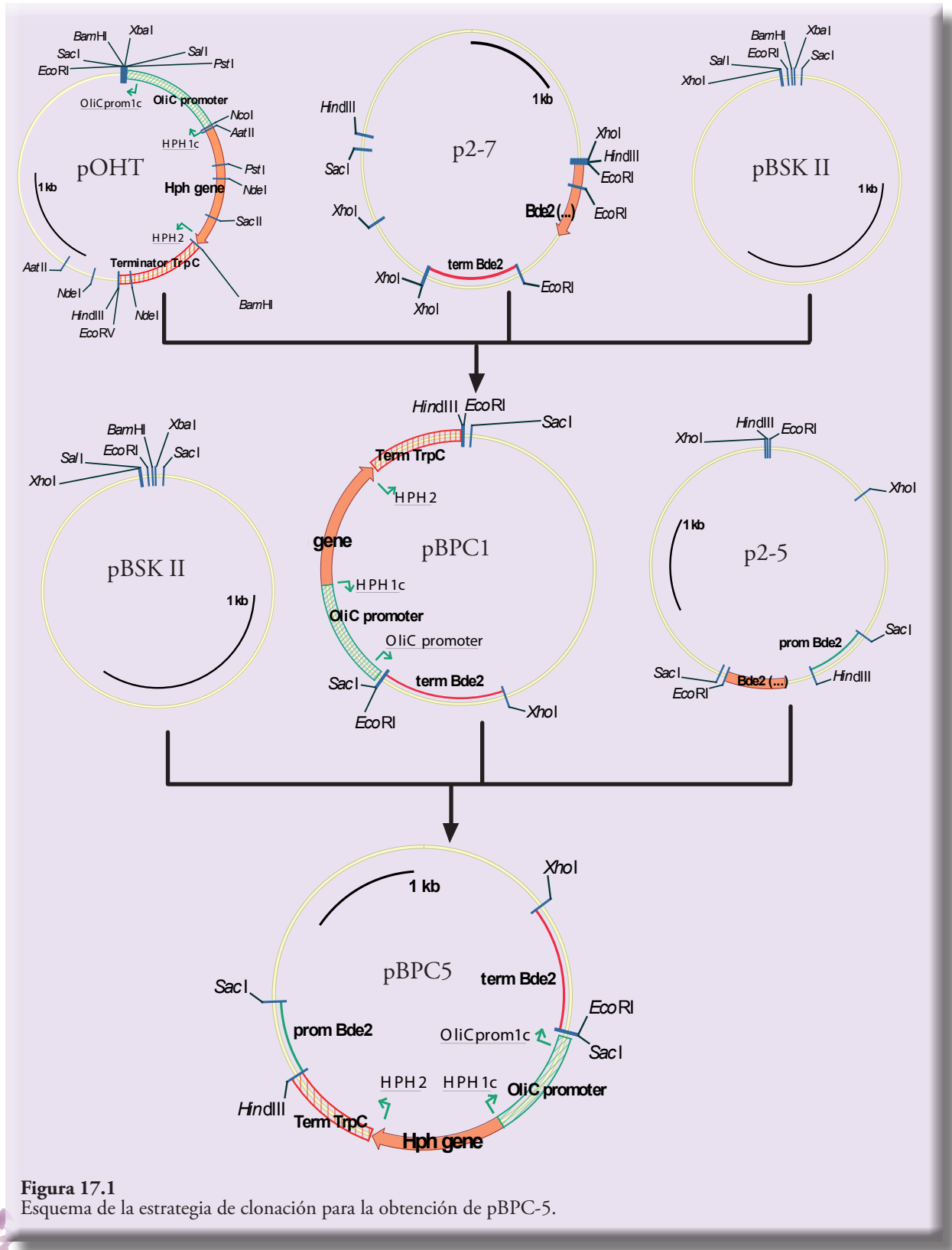


Figura 17.1
Esquema de la estrategia de clonación para la obtención de pBPC-5.

como un fragmento de 4.654 pares de nucleótidos con extremos *Hind*III y *Eco*RI. En paralelo se digirió el vector pBlueScript SK con las enzimas de restricción *Hind*III y *Xho*I. Los tres fragmentos obtenidos se ligaron generándose el plásmido pBPC1 de 6.625 pares de nucleótidos.

El plásmido pBPC1 se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I-*Hind*III y se obtuvo el fragmento cassette de resistencia a higromicina-terminador Bde2 de 3.685 pares de nucleótidos. El fragmento de la región promotora, de 590 pares de bases, se obtuvo mediante la digestión del plásmido p2-5 con las enzimas de restricción *Sac*I y *Hind*III. Al mismo tiempo se digirió el vector pBlueScript SK con las enzimas *Sac*I y *Xho*I. Los tres fragmentos se ligaron dando lugar al plásmido pBPC5 de 7.137 pares de nucleótidos. Se purificó DNA del mismo a gran escala.

17.3. Transformación de la cepa B05.10 de *B. cinerea*.

Se realizaron varios experimentos de transformación de la cepa B05.10 de *B. cinerea* siguiendo los procedimientos experimentales descritos en el apartado 11.6.c de la sección Materiales y Métodos. En estos experimentos se utilizó como DNA transformante el plásmido pBPC5, bien linearizado bien en forma circular. En cada experimento de transformación se realizó en paralelo una transformación control sin añadir DNA.

De dos a tres días después de que se sembrara la mezcla de transformación en placas de medio selectivo los transformantes, fácilmente visibles emergiendo de la cobertera, fueron transferidos individualmente a placas frescas de medio SH suplementado con 100 µg/ml de higromicina para confirmar su naturaleza transformante. Se seleccionaron un total de 76 transformantes. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que la colonia en crecimiento alcanzó el borde de la placa petri. Se transfirieron entonces pequeños bloques de agar del borde de la colonia en crecimiento a una nueva placa de medio selectivo. Debido a la naturaleza multinuclear de *B. cinerea* se realizaron réplicas sucesivas (4-6) para enriquecer las hifas con núcleos transformados. Finalmente, se extrajo DNA del micelio aéreo desarrollado en placa para el análisis y selección de los transformantes.

17.4. Selección de candidatos mediante PCR

Para identificar aquellos transformantes en los que pudiese haber tenido lugar una transformación integrativa que hubiese determinado el reemplazamiento génico del gen Bde2, se diseñó una estrategia rápida de análisis de los transformantes basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

Mediante esta estrategia se trata de determinar si en el genoma de los transformantes existe o no una copia intacta del alelo silvestre del gen que se desea eliminar, en nuestro caso el gen Bde2. Para ello se diseñaron 3 parejas de oligonucleótidos (ver Figura 17.2):

- **BC-CYC-1** (5'-CTACACGCGAGGATCAG-3') y **BC-CYC-2** (5'- ACGGAAGTCGA-AGCTAG-3') que permiten amplificar un fragmento de 451 nucleótidos de la región codificante del gen Bde2, presente en la cepa tipo silvestre y que ha sido eliminada en el alelo del gen Bde2 que ha sido clonado en el vector de reemplazamiento génico. La amplificación o no amplificación de este fragmento permite determinar la presencia o ausencia del alelo silvestre del gen Bde2 en los transformantes analizados.
- **OLiCprom1c** (5'-CCACTTAGTGGCAGTCGCG-3') y **CYCterm3r** (5'-CCCTGTACTGCGTCACTTTGG-3') que permiten amplificar un fragmento de 1.269 nucleótidos solamente en el caso de que se haya producido un evento de recombinación homóloga en el fragmento flanqueante 3' del gen Bde2 clonado en el plásmido BPC5.
- **CYCprom3** (5'-GGTAATGGGCGCCATGTTGG-3') y **HPH2** (5'-GCCGATAGTG-GAAACCGACG-3') que permiten amplificar un fragmento de 1.452 nucleótidos solamente cuando se haya producido un evento de recombinación homóloga en el fragmento flanqueante 5' del gen Bde2 clonado en el plásmido BPC5.

Debido al elevado número de transformantes a analizar se empleó un método de extracción

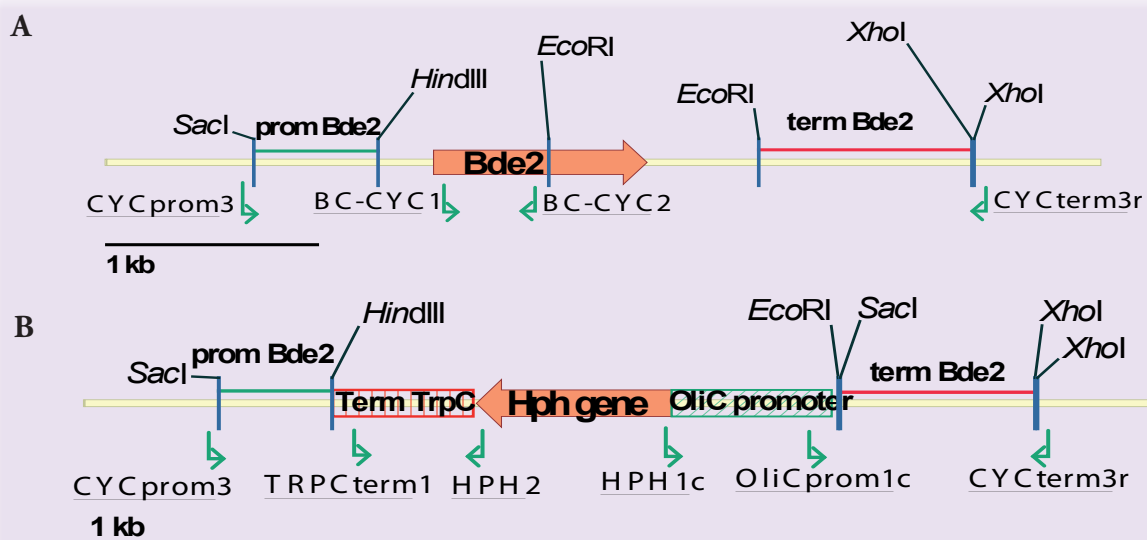


Figura 17.2

A: Organización del locus Bde2 tipo silvestre.

B: Organización esperada del locus Bde2 en un mutante por reemplazamiento génico obtenido con el plásmido pBPC5.

de ADN rápido y sencillo que proporciona pequeñas cantidades de ADN pero de calidad suficiente para su empleo como molde en reacciones de PCR. Este método está basado en la utilización de micelio aéreo obtenido directamente de las placas sobre las que se cultivan los transformantes (apartado 10.1.a.2 de Materiales y Métodos).

Para el análisis de los transformantes procedentes de la transformación con pBPC-5 se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico de cada transformante e incluyendo los oligonucleótidos que amplifican, en su caso, el fragmento de la región codificadora del gen *Bde2* (BC-CYC-1 y BC-CYC-2) y los oligonucleótidos que permiten identificar los fragmentos característicos originados si ocurre un evento de reemplazamiento génico (OLICprom1c y CYCterm3r; CYCprom3 y HPH2).

La Figura 17.3 muestra los resultados obtenidos sobre una muestra representativa de transformantes analizados que muestran alguna de las bandas diagnósticas. En algunos transformantes se detecta sólo la banda indicativa de recombinación homóloga en el extremo 5' flanqueante (por ejemplo, en los transformantes número 4 y 27). En otros se detecta únicamente la banda diagnóstica de un evento de recombinación homóloga en la región flanqueante 3' (por ejemplo, en los transformantes número 24 y 25). En la mayor parte de los casos se detectan simultáneamente ambos fragmentos (transformantes número 2, 3, 6, 8, 9, 12, 16, 21, 23, 28, 32). Estos últimos son transformantes en los que se han producido dos eventos de recombinación homóloga en ambas regiones flanqueantes y en los que, por lo tanto, el alelo silvestre del gen *Bde2* ha sido eliminado por reemplazamiento génico. Para determinar que son mutantes en el gen *Bde2* habría que confirmar que el alelo silvestre ha sido eliminado y que el alelo mutante se encuentra en homocariosis. Desafortunadamente, en todos los transformantes analizados se detectó mediante PCR el fragmento de ADN correspondiente al alelo silvestre del gen *Bde2*. Estos resultados indican que, aunque se ha producido reemplazamiento del gen *Bde2*, no existen transformantes portadores de la mutación en homocariosis y por tanto no ha tenido lugar la eliminación completa de la copia residente del gen *Bde2*. En total se han analizado de esta manera 76 transformantes primarios. De éstos, 16 resultaron de integración en el extremo 3' y 1 de integración en el extremo 5'. Se obtuvieron además 21 candidatos en la que se detectó reemplazamiento génico y 28 transformantes ectópicos. Los 21 posibles candidatos, que habían sufrido el evento de doble recombinación, se estudiaron más profundamente.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

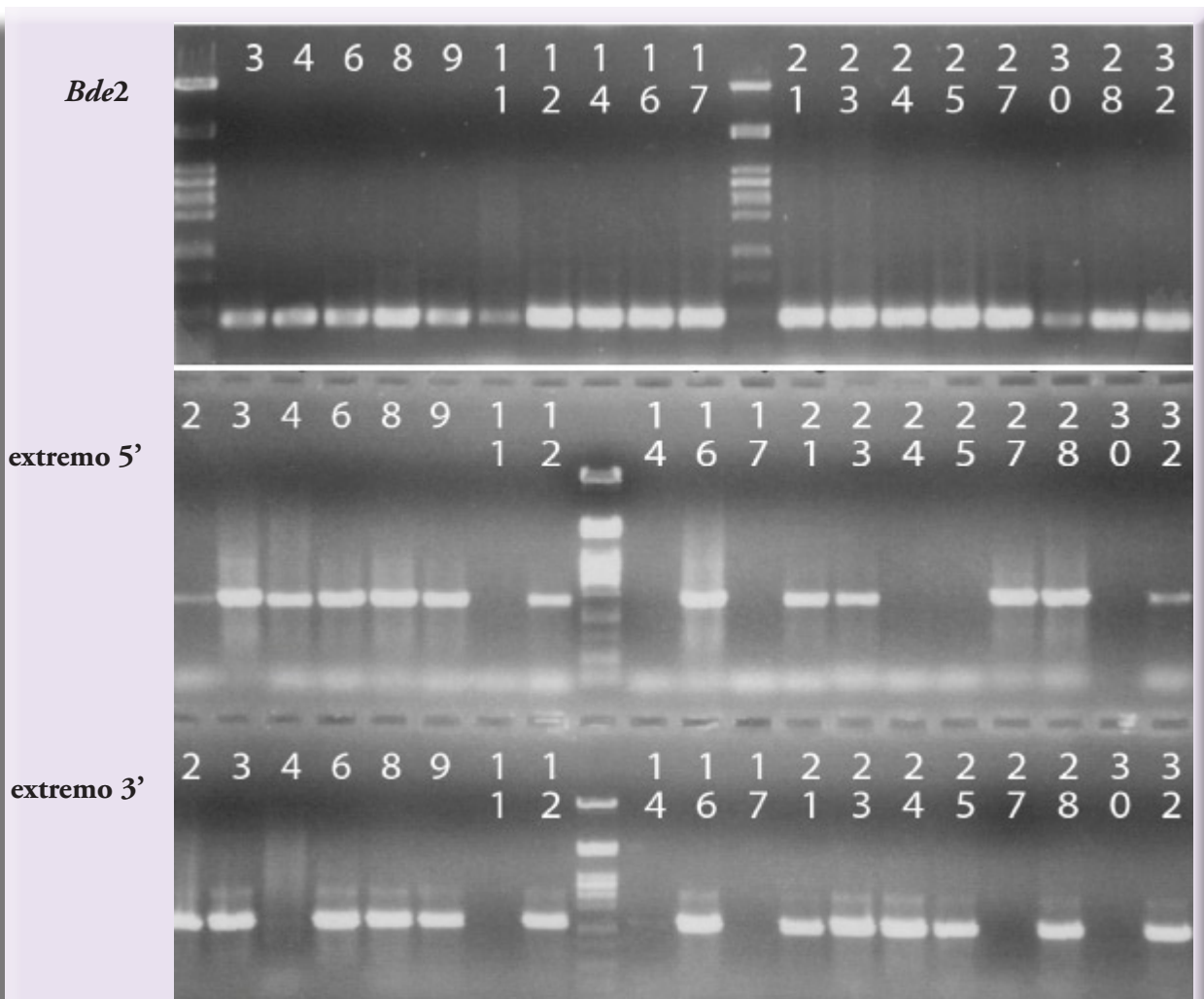


Figura 17.3

Análisis mediante PCR de transformantes primarios obtenidos con el plásmido pBPC5. Se utilizaron las combinaciones de cebadores que permiten amplificar un fragmento de la región codificante del gen *Bde2*, el fragmento diagnóstico de recombinación en el extremo 5' flanqueante o el fragmento diagnóstico de recombinación en el extremo 3' flanqueante.

17.5. Purificación de cultivos monospóricos

Para tratar de favorecer la aparición en homocariosis del alelo mutante se seleccionaron los 21 transformantes primarios en los que el alelo mutante aparecía en heterocariosis y se purificaron cultivos monospóricos de cada uno de ellos. En cada caso se sembraron en placas petri con medio MEA 100 esporas de cada transformante individual. Transcurridas 24 horas se transfirieron de forma individualizada, con ayuda de una aguja enmangada y en la lupa, esporas ya germinadas a placas de medio MEA suplementado con 100 µg/mL de higromicina. Las esporas generaron colonias que fueron transferidas a placas frescas de medio selectivo a partir del borde de crecimiento de las mismas. El

proceso se repitió durante cuatro ciclos de réplica sucesivos. Finalmente se recogieron esporas de cada cepa monospórica que se conservaron como cultivos independientes. De cada transformante candidato se conservaron individualmente tres cultivos monospóricos diferentes derivados cada uno de ellos de una espóra única.

Una vez realizada la purificación de cultivos monospóricos se seleccionó una cepa derivada de cada transformante primario identificado previamente como portador del alelo mutante en heterocariosis. Se extrajo DNA de cada uno de ellos y se llevó a cabo el análisis de las cepas seleccionadas mediante PCR. La figura 17.4 muestra los resultados obtenidos con una muestra representativa de los transformantes seleccionados y ya purificados como cultivos monospóricos. En ninguno de los 21 transformantes analizados fue posible detectar la copia del alelo mutante del gen *Bde2* en homocariosis. A pesar de amplificarse en todos ellos las dos bandas diagnósticas de recombinación en uno y otro extremo flanqueante del gen *Bde2*, también en todos ellos se amplifica la banda correspondiente al alelo silvestre.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el gen *Bde47* en este trabajo, los resultados obtenidos por nuestro propio grupo y por otros colaboradores durante el curso de la obtención y aislamiento de mutantes en genes diversos utilizando una aproximación de reemplazamiento génico similar a la considerada ahora, creemos que la imposibilidad de generar mutantes en el gen *Bde2* nos está indicando que el producto codificado es esencial para la supervivencia del organismo.

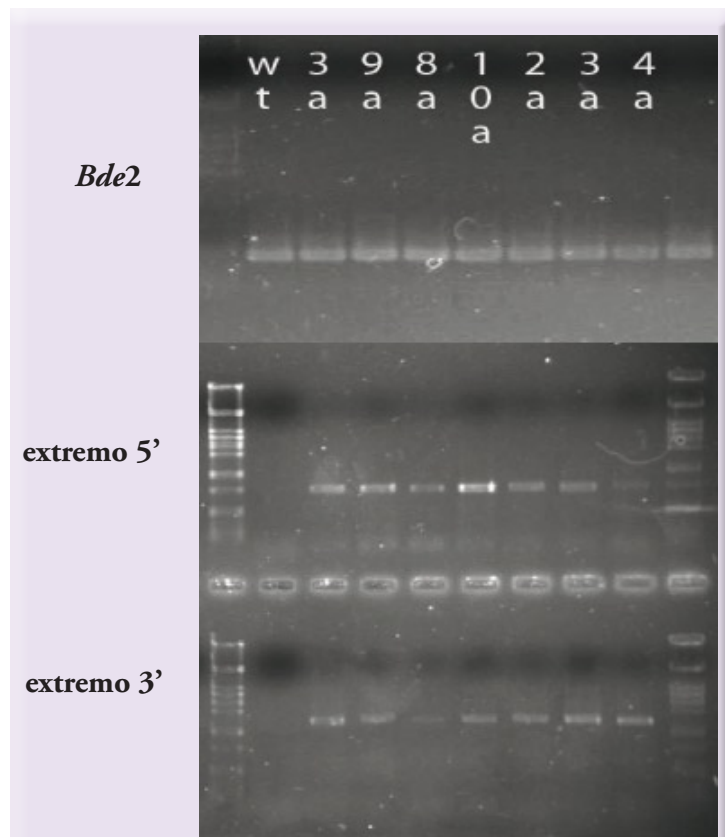


Figura 17.4
Análisis mediante PCR de cultivos monospóricos derivados de transformantes primarios portadores del alelo mutante en heterocariosis.

Discusión



Teniendo en cuenta nuestras limitaciones como seres humanos y aceptando que la obra del hombre por naturaleza es incompleta y, a veces, defectuosa, debemos de concienciarnos de que los resultados de un trabajo nunca pueden ser tomados como axiomas o como conclusiones categóricas, y sí como aproximaciones discutibles hacia un modelo universal, o al menos, aceptado y consensuado por la mayoría de los expertos en ese campo.

En este trabajo nos hemos encontrado con diversas dificultades que no se preveían en un principio y que se han intentado abordar y superar de la mejor manera posible. Esto, más que un inconveniente, se ha considerado como una ventaja, al ofrecer cierto grado de dificultad y de desafío que han servido de estímulo y que han potenciado la búsqueda de métodos y caminos alternativos a las estrategias fijadas originalmente, enriqueciendo de alguna manera este trabajo y aumentando el “Know How” en nuestro laboratorio. Se aprende más de los errores que de los aciertos, ya que los éxitos inmediatos nos llevan hacia una falsa sensación de seguridad.

No con esto intentamos justificar un trabajo que pueda considerarse incompleto, sino que intentamos darle la categoría que se merece, ya que al ir avanzando en la consecución de resultados, nos dábamos cuenta de que el trabajo requería de un tiempo y esfuerzo mayor que el previsto en un principio y que, en consecuencia, no ha podido ser concluido como se esperaba inicialmente. De todos modos, ¿qué investigación científica puede darse por concluida totalmente? Siempre que se avanza en un campo nuevo surgen nuevas preguntas a responder y nuevos problemas que resolver. Ahí reside el encanto de la investigación: intentar aplacar el insaciable hambre de conocimiento del ser humano.

Dicho esto, queremos dar nuestro punto de vista y justificación a los resultados obtenidos a lo largo de estos años de experimentación y estudio, siempre abiertos a la crítica constructiva y a la discusión responsable y respetuosa.

18. Elección de metodologías

A día de hoy, puede que algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo se consideren anticuadas u obsoletas, ya que la secuenciación de genomas completos y la expresión de genes a tiempo real mediante PCR son las pautas que marcan el estándar a seguir en el presente. Cabe reseñar, en este aspecto, que el trabajo tuvo su comienzo en 1994 y que empezó a gestarse más seriamente en 2002, lo que hace que algunas de las técnicas expuestas fueran la única opción viable o, en su caso, la metodología al alcance de nuestras manos y presupuesto.

Para el estudio de las interacciones planta-patógeno se han usado diversas técnicas experimentales dependiendo si la interacción es abordable de una manera directa o indirecta. Entre las técnicas “directas” tenemos la obtención de mutantes por mutagénesis o silenciamiento génico, y entre las técnicas “indirectas” encontramos la expresión diferencial por RT-PCR, hibridación sustractiva, macroarrays y microarrays.

En un principio, el análisis diferencial de la expresión génica se ha apoyado en procedimientos de hibridación. En el análisis de las interacciones hongo patógeno – planta estos procedimientos se han utilizado satisfactoriamente en el aislamiento de genes codificantes de estructuras de infección y genes inducidos durante la patogénesis. Estos procedimientos, laboriosos, lentos y con una sensibilidad limitada, han sido sustituidos por procedimientos basados en PCR, como el estudio de la expresión diferencial mediante DDRT-PCR. Este método es más rápido y con una sensibilidad mayor, al estar basado en PCR. Debido a su mayor sensibilidad este método ha permitido el estudio y análisis de sistemas donde la cantidad de material biológico es escasa, como ocurre en las etapas tempranas del proceso de infección.

Actualmente, existen técnicas mucho más precisas y modernas que la expresión diferencial por RT-PCR, pero en el momento de empezar este estudio esta técnica se mostraba como un buen procedimiento experimental para el análisis y caracterización de los factores y mecanismos de patogenicidad de *B. cinerea* durante su interacción con tomate.

Esta manera de afrontar la caracterización de nuevos genes tiene sus ventajas e inconvenientes. Por un lado nos ofrece la oportunidad de identificar factores que no se aprecian de manera directa y que pueden jugar un papel relevante en el proceso de infección, mostrándose como una herramienta muy útil en el descubrimiento de nuevos genes. Por otro lado, nos encontramos con

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

una información tan nueva y desconocida que es más difícil de caracterizar, al no existir estudios o información previa relacionada. Esto hace que en muchos casos el análisis sea más laborioso, ya que no se puede extrapolar información de los resultados de otros trabajos científicos ni comparar las secuencias obtenidas en bases de datos públicas.

En nuestro caso, los genes que hemos detectado en este trabajo, son los primeros de su tipo que se describen en hongos, haciendo más costosa la formulación de hipótesis de trabajo y la demostración de las mismas, aunque esto también provoca un enriquecimiento en la generación de gran número de ideas, explicaciones y soluciones posibles.

Durante el análisis de la expresión génica diferencial de *B. cinerea*, se detectaron varias señales derivadas de genes cuya expresión resulta específicamente inducida, o al menos aumentada in planta durante la interacción del hongo con distintos huéspedes lo que hace suponer que los productos génicos asociados a estos genes estarán implicados en el proceso de infección. En el presente trabajo se han analizado dos de estas señales y sus genes asociados (Bde47A, Bde47B y Bde2).

19. Los genes derivados del cDNA ddB47

19.1. El gen *Bcmimp1*

El gen Bde47A, denominado posteriormente en este trabajo *Bcmimp1*, es el gen que codifica el RNA mensajero de mayor tamaño de los dos RNA mensajeros detectados mediante hibridación Northern con el fragmento de “differential display” ddB47. Los resultados obtenidos en esta hibridación Northern nos presentan una situación curiosa, dado que un fragmento único de DNA, en este caso de cDNA, permite detectar dos RNA mensajeros distintos. En un principio pudieran considerarse dos situaciones diferentes para explicar estas observaciones. Primera: existe un único gen cuya expresión puede dar lugar a dos RNA mensajeros distintos como consecuencia de procesos de procesamiento alternativo de intrones. Y segunda, existen dos genes diferentes que comparten similitud al menos en parte de la secuencia que resulta transcrita y que dicha secuencia forma parte de la secuencia a partir de la cual se ha generado el fragmento ddB47. Los resultados derivados del análisis detallado de la secuencia del fragmento de DNA genómico de *B. cinerea* detectado e identificado mediante hibridación en condiciones altamente restrictivas con la sonda ddB47, el análisis de los patrones de hibridación obtenidos en los experimentos de hibridación Southern con la misma sonda y los resultados obtenidos en las hibridaciones Northern llevadas a cabo con distintos fragmentos de DNA marcados derivados de la secuencia correspondiente a la única fase de lectura abierta identificada en la región genómica identificada con el fragmento ddB47, indican que es la segunda opción considerada la correcta. Una vez conocida la secuencia del fragmento ddB47, del gen *Bcmimp1* y del genoma de la cepa B05.10 de *B. cinerea* en su conjunto es posible proponer que en el genoma de *B. cinerea* existen numerosas secuencias caracterizadas por incluir regiones ricas en los nucleótidos A y G que, al menos en algunos casos, determinan regiones con secuencias tipo microsatélite. Es posible concluir, además, que dos de estas regiones forman parte de la región estructural de dos genes distintos, uno de los cuales es el gen *Bcmimp1*. Aunque ambos genes deben compartir similitud al menos en una parte de su secuencia de nucleótidos, es necesario indicar que ambos genes no tienen por qué estar relacionados funcionalmente.

El análisis del alineamiento de la secuencia del fragmento de cDNA ddB47 y de la copia genómica del gen codificador del RNA mensajero correspondiente y los experimentos de hibrida-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

ción Northern resultaron particularmente útiles a la hora de identificar y mapear la región donde se inicia la transcripción del gen y la localización de la señal de poliadenilación. Dado que no existen secuencias de genes homólogos a *Bcmimp1* caracterizados funcionalmente en ningún organismo, esta información ha sido fundamental para identificar la fase de lectura correcta y determinar, por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

El gen *Bcmimp1* fue identificado teniendo en cuenta su patrón de expresión durante su interacción con tomate. El gen presenta, como hemos visto, un patrón de expresión transitoria, con máximos de expresión a las 16 hpi, fase de penetración en el tejido del huésped, a las 72 hpi, fase de formación de lesiones dispersivas, y a las 120 hpi, fase de colonización y maceración del tejido infectado. Estas fases corresponden, en una primera aproximación, con las fases de crecimiento más activo del hongo durante la interacción con el huésped. A las 32 hpi la expresión tiene un nivel bajo, similar al nivel de expresión durante el crecimiento saprofito a las 16 horas de cultivo. En esta fase la planta parece ser capaz de mantener controlado al hongo en la mayor parte de las lesiones necróticas inducidas en los primeros estadios de la interacción. El crecimiento del hongo en estos momentos es muy limitado. A las 96 hpi el nivel de expresión de *Bcmimp1* también es bajo, lo cual resulta ciertamente sorprendente teniendo en cuenta que en esta fase el hongo sí está creciendo activamente a partir de las pocas lesiones primarias en las que el hongo parece superar las barreras defensivas de la planta y a partir de las cuales es capaz de colonizar todos los tejidos circundantes (Benito *et al.*, 1998).

Es posible asumir, y en ello se sustenta la aproximación experimental sobre la que se basa este trabajo, que un aumento de la expresión de un gen en unas condiciones dadas supone la participación de su producto génico en el proceso analizado en esas condiciones. El análisis de las señales de localización subcelular en la proteína codificada por el gen *Bcmimp1* y los experimentos de colocalización llevados a cabo con la proteína fusión BCMIMP1-GFP demuestran que, efectivamente, BCMIMP1 es una proteína de localización mitocondrial, muy probablemente anclada en la membrana interna mitocondrial. En una primera aproximación es posible proponer, por lo tanto, que en las fases en las que el nivel de expresión de *Bcmimp1* es mayor, esencialmente las fases de crecimiento más activo del patógeno in planta, es necesaria una mayor (o más intensa) actividad mitocondrial o, al menos, una mayor actividad de algunos componentes mitocondriales, en particular aquél/aquéllos, de los que forma parte la proteína BCMIMP1.

19.2. El gen *Bcmimp1* y su relación en el metabolismo mitocondrial.

Las mitocondrias son unos orgánulos eucariotas complejos que juegan un papel crucial en diversos procesos celulares (Scheffler, 2001), como la producción de energía (mediante la fosforilación oxidativa) (Saraste, 1999) y la muerte celular programada. Se componen de una matriz rodeada por dos membranas, una externa y otra interna, que definen un espacio intermembranal. La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear, siendo el genoma mitocondrial el encargado de codificar ciertos RNAs y ciertos componentes esenciales de la cadena respiratoria. La membrana interna contiene proteínas de la cadena respiratoria y una gran cantidad de proteínas transportadoras y canales de iones, responsables del importante papel que tienen las mitocondrias en la homeostasis celular. Muchas de estas proteínas aún están sin caracterizar, aunque se consideran indispensables para el buen funcionamiento de la actividad mitocondrial. Se considera que las deficiencias o alteraciones de la actividad de algunas de ellas son causa de la producción de niveles anormalmente elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS), presentes en un vasto número de procesos patológicos y de procesos relacionados con la senescencia (Dufour *et al.*, 2000; Osiewicz, 2002).

La respiración mitocondrial se basa en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno (aceptor final de electrones) a lo largo de complejos respiratorios que forman parte de una cadena respiratoria, consistente en tres grandes complejos proteicos embebidos o anclados en la membrana interna mitocondrial: el complejo I (NADH:ubiquinone oxidoreductasa), el complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa). Los electrones fluyen desde el complejo I hasta el complejo III a través de la ubiquinona (coenzima Q), y desde el complejo III hasta el complejo IV a través del citocromo c. La ubiquinona difunde libremente en la membrana interna mitocondrial. Por su parte, el citocromo c es una proteína soluble localizada en el espacio intermembranal. En cada uno de estos complejos el transporte de electrones está acoplado con la translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, lo que genera la fuerza protón motriz que se utiliza para sintetizar finalmente ATP. Los electrones también son cedidos desde el succinato a la ubiquinona por medio de la succinato deshidrogenasa (complejo II), embebida igualmente en la membrana interna mitocondrial, pero en este caso la transferencia de electrones no está acoplada al transporte de protones. Esta cadena respiratoria no funciona siempre a la perfección, y durante su funcionamiento algunos electrones escapan de la cadena, los cuales pueden provocar daños en las membranas y componentes mitocondriales, generando estrés

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

oxidativo en la célula, como comentaremos más adelante. Para minimizar estos daños las células disponen de mecanismos implicados en la eliminación de estos radicales libres para atenuar, al menos parcialmente, los efectos que éstos producen en la mitocondria.

En hongos y plantas, a diferencia de lo que sucede en los sistemas animales, nos encontramos con cadenas respiratorias ramificadas que incluyen diversas NADH deshidrogenasas que utilizan como sustrato tanto NADH matricial como NADH citoplasmático y enzimas de tipo oxidasa alternativa que probablemente acepten electrones directamente de la ubiquinona. En algunas especies de hongos el complejo I está ausente. A pesar de que estas alternativas al modelo lineal son poco conservadoras en términos energéticos, aseguran que la transferencia de electrones desde el NADH ocurra al menos en algún lugar, permitiendo que la respiración continúe incluso cuando se inhibe alguno de los componentes principales de la cadena respiratoria. Esto puede ser de vital importancia en hongos que sean patógenos, ya que las respuestas defensivas de la planta están enfocadas a la inhibición de la transferencia de electrones respiratoria (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

La oxidasa alternativa (AOX) actúa en paralelo con el complejo III en la oxidación de la ubiquinona y en la reducción de O_2 a H_2O (Moore y Siedow, 1991). La AOX es una proteína codificada nuclearmente y se encuentra en la mayoría de los hongos estudiados, incluido *B. cinerea* (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Esta enzima parece tener su expresión regulada por mecanismos complejos. En un principio se creía que sólo se expresaba cuando la ruta principal de oxidación de la ubiquinona estaba inhibida (Sherald y Sisler, 1970; Weiss-Berg y Tamm, 1971), pero estudios posteriores indicaron que la AOX estaba inducida por superóxido indiferentemente del estado funcional de la cadena respiratoria. Se cree que su transcripción es constitutiva, pero la traducción y la activación ocurren bajo determinadas circunstancias (Yukioka *et al.*, 1998), como el cese del flujo de electrones o niveles elevados de H_2O_2 . El gen codificante de la AOX muestra muy poca similitud en su secuencia cuando se comparan genes fúngicos de esta enzima con genes vegetales. La baja identidad a nivel de secuencia de aminoácidos puede explicar las diferencias en función y regulación entre planta y hongos, como la regulación positiva por piruvato en AOX vegetales y sin efecto en AOX fúngicas. La comparación de secuencias y análisis bioquímico encuentra similitudes entre la AOX y miembros de la familia proteica “R2-type diiron” (diiron carboxylate protein family) (Berthold *et al.*, 2000).

Siendo la función principal de las mitocondrias la producción de energía, un aumento de la expresión de genes codificadores de componentes mitocondriales en fases concretas del desarrollo del hongo, o del establecimiento de una interacción con el huésped, bien puede ser indicativa de una mayor necesidad de actividad mitocondrial durante esas fases para dar satisfacción a una mayor demanda de energía por parte del hongo en esas fases o condiciones particulares.

El gen *Bcmimp1* se expresa *in vitro* durante el crecimiento saprofitico. Inicialmente fue detectado en muestras derivadas de micelio cultivado *in vitro* recogidas después de 16 horas de cultivo en medio mínimo líquido. En esta fase el micelio del hongo es ya micelio maduro, micelio que se ha ramificado profusamente en fases anteriores y que ahora está creciendo fundamentalmente mediante la extensión y elongación de las hifas. El hecho de que el gen se exprese tanto *in planta*, aunque a diferente niveles en las distintas fases, como durante el crecimiento saprofitico, sugiere que el producto génico codificado forma parte esencial del “ecosistema proteico” de la membrana interna mitocondrial y que aquél sea necesario para la correcta organización o funcionamiento de la estructura de la que forma parte, la membrana interna mitocondrial y la mitocondria en sí misma.

Hemos obtenido evidencias que indican que, al igual que sucede *in planta*, durante el crecimiento saprofitico la expresión del gen *Bcmimp1* tampoco es constitutiva. Como situación control en el análisis de expresión génica diferencial llevado a cabo en un principio se utilizó micelio cultivado durante 16 horas en medio mínimo líquido y se comprobó que *in planta* la expresión del gen *Bcmimp1* aumenta significativamente en distintas fases de la interacción en relación con el nivel de expresión en aquel micelio. En el análisis realizado en el curso de la caracterización molecular del transformante que expresa la fusión BCMIMP1-GFP pudimos comprobar que la expresión de *Bcmimp1* es mayor en la cepa silvestre B05.10 (aproximadamente 3-4 veces, en función de la comparación de las intensidades relativas de las señales de hibridación) a las 5 horas que a las 16 horas. Si se hubiera utilizado como situación control micelio cultivado durante 5 horas en medio mínimo líquido, los niveles de inducción cuantificados *in planta* hubieran sido menores, en particular en las muestras derivadas de la interacción a las 16 hpi. A las 72 y las 120 hpi los niveles de inducción también hubieran sido menores, pero ciertos, siendo válida, por lo tanto, la observación de que la expresión del gen *Bcmimp1* resulta incrementada durante la interacción con el huésped.

Podemos concluir de los estudios de expresión realizados en este trabajo que la expresión de *Bcmimp1* está regulada, tanto durante el crecimiento saprofitico como durante la interacción con el huésped, aunque por el momento no disponemos de información sobre los factores o estímulos que modulan su expresión. El análisis de expresión transitoria que observamos *in planta* puede ser un reflejo de las necesidades de actividad mitocondrial (necesidades energéticas) que el hongo experimenta en las distintas fases del proceso de infección, ya que el nivel de expresión resulta ser mayor en aquellos momentos o fases en los que cabe anticipar un mayor desarrollo y una mayor tasa de crecimiento del hongo y unas mayores necesidades de energía. En este contexto no resulta sencillo integrar la observación de la caída en los niveles de expresión a las 96 hpi, cuando el hongo se está expandiendo activamente a partir de las lesiones dispersivas. No obstante, cabría considerar que la

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

expresión de *Bcmimp1* podría aumentar en aquellos momentos en los que es necesario producir o generar nuevas poblaciones de mitocondrias para satisfacer las necesidades energéticas que el hongo anticipa que va a experimentar en momentos o fases posteriores. Una vez activada la transcripción, los RNA mensajeros producidos serán transcritos para dar lugar a los productos génicos correspondientes en las cantidades que el sistema estime que necesita. Probablemente, con este objeto no sea necesario mantener de manera permanente una tasa de transcripción elevada. Un patrón de expresión en forma de “pulsos de expresión” pudiera ser indicativo de la necesidad de génesis de componentes mitocondriales y de poblaciones de mitocondrias en fases concretas del proceso de infección y, quizás, del crecimiento del hongo de manera general. Una vez producidas, éstas cumplirán con su cometido y la expresión del gen *Bcmimp1* podrá volver a niveles basales hasta que el sistema detecte la necesidad de producir una nueva población de mitocondrias para satisfacer las necesidades de una nueva fase de crecimiento activo. Cabe destacar en este contexto que, efectivamente, la expresión de *Bcmimp1* durante el crecimiento saprofito es mayor a las 5 horas de cultivo en medio líquido, durante la germinación de las esporas y la emisión de los tubos germinativos, que a las 16 horas, cuando el micelio crece por extensión y elongación de las hifas.

19.3. La proteína BCMIMP1 en la mitocondria

¿Qué podemos proponer sobre la función de la proteína BCMIMP1? Con frecuencia una primera fuente de información sobre la función de un gen y de un producto génico se deriva de la caracterización del gen ortólogo llevada a cabo en otro sistema. En nuestro caso esta fuente de información es muy limitada. Mediante un análisis BLAST se detectan secuencias relacionadas en otros organismos. La mayor parte derivan de hongos, pero en ningún caso se dispone de información funcional derivada de experimentación directa. Es decir, el gen correspondiente no ha sido caracterizado funcionalmente en ningún sistema hasta el momento. Los niveles de homología que se observan con las secuencias de las proteínas deducidas codificadas por los genes detectados en las distintas especies de hongos y el hecho de que la homología se extienda prácticamente a lo largo de toda la longitud de la proteína sugiere que los genes codificadores correspondientes son realmente ortólogos. Como reflexionábamos en la sección de resultados, nuestro análisis de similitud de secuencia permite identificar además secuencias similares en algunas especies de bacterias y, en medida muy limitada, en plantas y animales, pero el estudio detallado de los alineamientos y de la homología global nos permite concluir que estas secuencias de origen bacteriano, de plantas y animales no corresponden a genes ortólogos de *Bcmimp1*. Muy probablemente nuestro análisis está identificando proteínas

que muestran una organización estructural (en términos de número de dominios transmembranales y de tamaño de regiones inter dominios transmembranales) similar, pero no codificadas por genes ortólogos propiamente dichos. Consideramos, con la información acumulada hasta el momento, que el gen *Bcmimp1* es el gen tipo de una clase de genes exclusiva de hongos, de la cual encontramos los representantes correspondientes en un buen número de especies pertenecientes a los distintos grupos taxonómicos de hongos y que no ha sido caracterizado previamente.

La proteína BCMIMP1 no presenta dominios característicos de proteínas con actividad enzimática y parece ser una proteína de membrana, localizada en la mitocondria, probablemente en la membrana interna mitocondrial. Ambos extremos, amino y carboxilo, de la proteína están orientados hacia el mismo espacio. Aunque no disponemos de evidencias experimentales directas a este respecto, es posible proponer que este espacio es el espacio intermembranal. Debemos recordar que el análisis de dominios transmembranales propone que ambos extremos están orientados en la misma orientación, dada la presencia de un número par de dominios transmembranales, y propone que es hacia el interior del espacio delimitado por una membrana. Pero en el caso de la membrana interna mitocondrial se trata de una membrana que delimita un espacio, la matriz mitocondrial, dentro otra membrana, la membrana externa mitocondrial que aísla el orgánulo del exterior. En este caso el “interior” debería corresponder al espacio intermembranal, espacio hacia el que se orientan la mayor parte de los complejos proteicos anclados en la membrana interna mitocondrial, como por ejemplo los complejos de la cadena de transporte de electrones.

Por otra parte, una característica de la proteína BCMIMP1 a tener muy en cuenta en relación con la determinación de su posible función es la naturaleza ácida de la región terminal del extremo carboxilo de la proteína. Los extremos carboxi-terminales de naturaleza ácida de ciertas proteínas parecen tener un papel importante en el establecimiento de interacciones proteína-proteína (Kong y Richardson, 1998; Ohkuma *et al.*, 1995). La modificación de este extremo pudiera ser suficiente para determinar la pérdida de función de BCMIMP1, lo que permitiría dar explicación al fenotipo molecular (alteración de la expresión génica del alelo silvestre de *Bcmimp1*) que muestra el “diploide parcial” que en términos genéticos representa el transformante que expresa la fusión génica *Bcmimp1*-GFP. En este transformante la presencia simultánea del alelo silvestre y del alelo fusión determina, en comparación con el comportamiento de la cepa silvestre, una disminución de la expresión del alelo silvestre a las 5 horas de cultivo en medio mínimo líquido y un aumento muy importante del nivel de expresión a las 16 horas. Es decir, el comportamiento contrario al observado en la cepa silvestre. Es interesante destacar que a las 5 horas de cultivo las intensidades de las señales de hibridación de los transcritos de los dos alelos del gen *Bcmimp1*, el alelo tipo silvestre y

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

el alelo fusión, son muy similares, y la suma de ambas intensidades puede estimarse como similar a la intensidad de la señal del alelo tipo silvestre en la cepa B05.10 a ese mismo tiempo. Sin embargo, a las 16 horas de cultivo las intensidades de ambas señales aumentan, pero lo hace mucho más la correspondiente al alelo silvestre. Estas observaciones pudieran interpretarse asumiendo que son consecuencia de la activación de un sistema que detecta una alteración funcional derivada de la coexistencia de ambos alelos y, por lo tanto, de ambos tipos de proteínas derivadas. Podemos proponer que inicialmente ambas formas de la proteína son sintetizadas y que ambas formas son correctamente dirigidas a la membrana interna mitocondrial. Allí, una y otra compiten por ocupar su lugar físico de localización natural. Si la fusión de la proteína GFP al extremo carboxilo (de carácter ácido y probablemente implicado en interacciones con otras proteínas) de la proteína BCMIMP1 altera la capacidad de esta variante de la proteína para desempeñar su función, la actividad global de las mitocondrias en el transformante GMAS7 se vería mermada. Si el sistema detecta esta pérdida de función o de eficiencia y rendimiento, el propio sistema puede tratar de compensar dicha pérdida o disminución forzando la producción en mayores cantidades de los componentes necesarios, en este caso de la propia proteína BCMIMP1. Y esto exigiría un aumento de la transcripción de su gen codificante.

En resumen, teniendo en cuenta los elementos de información que acabamos de discutir, podemos sugerir que BCMIMP1 es una proteína estructural de la membrana interna mitocondrial que pudiera desempeñar una función relacionada con el mantenimiento de la estructura característica de la membrana o una función de anclaje de otros elementos funcionales de la misma mediada por la capacidad de interacción del extremo carboxilo de la proteína con otras proteínas o con complejos proteicos embebidos en ella.

19.4. Papel del gen *Bcmimp1* durante la interacción *B. cinerea*-tomate.

Un análisis funcional detallado para determinar cuáles son los procesos en los que el gen (su producto génico) participa y cuáles son las funciones precisas en las que juega un papel relevante exige obtener el mutante deficiente en el gen de interés y llevar a cabo una caracterización fenotípica del mismo. Hemos aplicado una estrategia de reemplazamiento génico que nos ha permitido obtener mutantes por delección del gen *Bcmimp1* y con una frecuencia elevada. De un total de 46 transformantes primarios analizados, 12 fueron identificados como candidatos después de aplicar el procedimiento de enriquecimiento en núcleos transformados de los transformantes primarios. Después de la purificación en forma de cultivo monospórico se analizaron 8 de los candidatos mediante

hibridación Southern, confirmando que en 6 de ellos el alelo silvestre había sido eliminado y que el alelo mutante estaba en homocariosis. En los otros dos, el alelo mutante aún estaba en heterocariosis, aunque ciertamente la proporción de núcleos portadores del alelo silvestre era en ambos casos muy baja teniendo en cuenta la intensidad relativa de las bandas de hibridación que identifican al alelo mutante y al alelo silvestre. Esta frecuencia de obtención de mutantes por reemplazamiento génica es elevada, pero está en el rango de las frecuencias descritas en trabajos similares llevados a cabo en *B. cinerea* (Valette-Collet *et al.*, 2003; van Kan *et al.*, 2007).

En este trabajo hemos analizado 4 cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ (12ab, 26ac, 27ab y 31aa) que han sido comparadas con la cepa silvestre (la cepa denominada regenerante C4) en distintos aspectos. Una primera observación que se deriva de nuestro análisis es que la mutación no es letal, ya que efectivamente hemos podido obtener las cepas mutantes correspondientes y cultivarlas en medios sintéticos. Pero, ¿podemos observar alteraciones fenotípicas evidentes en los mutantes como consecuencia de la misma? Tratándose de una proteína mitocondrial podríamos proponer que de la eliminación del gen codificador correspondiente pudieran derivarse alteraciones del metabolismo mitocondrial que pudieran, a su vez, determinar alteraciones fenotípicas más o menos evidentes. Nos planteamos en un principio abordar la determinación de posibles alteraciones en la tasa de respiración en las cepas mutantes, siempre en comparación con la cepa silvestre. Desafortunadamente, la estimación de la tasa de respiración en *B. cinerea* ha resultado una tarea enormemente complicada como consecuencia fundamentalmente de la escasísima reproducibilidad que se obtiene en el sistema. Es una observación que se ha derivado de nuestro trabajo y también del trabajo realizado en otros laboratorios (Paul Wood, comunicación personal). No disponemos, por lo tanto, de datos fiables a este respecto, si bien es posible indicar que en los mutantes $\Delta Bcmimp1$ parece haber una menor tasa de respiración a través de la ruta convencional (complejo I, III y IV), aumentando la tasa de respiración a través de la rama de la enzima oxidasa alternativa (resultados no presentados). Es esta una vía de investigación sobre la que nos proponemos progresar en el futuro, ya que experimentos preliminares llevados a cabo para determinar alteraciones en el nivel de expresión del gen *Bcaox1* parecen indicar que su transcripción aumenta en las cepas mutantes en relación con el nivel observado en la cepa silvestre.

Sea cual sea la alteración primaria a nivel bioquímico y metabólico o estructural que pueda derivarse de la eliminación de la proteína BCMIMP1, aparentemente durante el crecimiento saprofito no se producen alteraciones o deficiencias evidentes. Así, la morfología de las esporas, tubos germinativos y micelio derivado parece normal y no observamos deficiencias en la capacidad de esporulación del hongo. Hemos evaluado su capacidad de crecimiento saprofito en medios sín-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

téticos, pobre y rico, en condiciones controladas de laboratorio estimando el diámetro medio de la colonia en placas de cultivo y no hemos detectado variaciones significativas en relación con la cepa silvestre. Su capacidad de crecimiento en estas condiciones no parece haber resultado alterada.

En cuanto a su capacidad para infectar a la planta huésped y para colonizar los tejidos infectados, los análisis llevados a cabo demuestran que las cepas mutantes no muestran una disminución de las mismas. Más bien es al contrario. Debemos recordar que en nuestra aproximación experimental hemos asumido que la expresión diferencial de un gen, o un aumento del nivel de expresión del mismo, en un proceso dado o en unas condiciones dadas, sugeriría la participación de su producto génico en el proceso considerado o la relevancia de su función en el desarrollo del organismo en las condiciones estudiadas. Si esta asunción es correcta, cabría esperar que los mutantes deficientes en el gen correspondiente, en nuestro caso el gen *Bcmimp1*, mostraran ciertas limitaciones, parciales o totales, a la hora de infectar y colonizar los tejidos de la planta huésped. En nuestro caso, en cuanto a la capacidad de penetración de las cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$, estimada valorando el porcentaje de lesiones dispersivas producidas, no se observa ninguna diferencia sobre ninguno de los dos huéspedes analizados, tomate y judía. Todas las cepas, silvestre y mutantes, y sobre los dos huéspedes, muestran un 100% de eficiencia de penetración y de formación de lesiones dispersivas en las condiciones de laboratorio utilizadas. Y en cuanto a la capacidad para colonizar el tejido infectado a partir de las lesiones primarias no observamos una disminución de las cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ en relación con la cepa silvestre. Sorprendentemente, lo que se observa es un aumento de la agresividad, evaluada ésta mediante la estimación, a un tiempo dado desde la inoculación, del diámetro medio de la lesión dispersiva producida en comparación con la cepa silvestre. Esta situación es más evidente en tomate. En este caso las cuatro cepas mutantes presentan una media de diámetro de lesión claramente superior a la cepa silvestre y las diferencias con ésta son significativas. El comportamiento de tres de las cepas mutantes es muy uniforme. Una cuarta cepa (la número 12) muestra también una mayor agresividad, aunque el análisis estadístico indica que su diferencia de comportamiento en relación con la cepa silvestre no es tan acentuada. Aunque es de esperar un comportamiento de todas las cepas mutantes muy uniforme, es frecuente detectar diferencias entre unas y otras, diferencias que pueden tener su origen en factores diversos tales como alteraciones adicionales producidas durante la transformación como consecuencia de reorganizaciones locales o integraciones secundarias del plásmido o de modificaciones que el propio proceso de transformación mediada por tratamiento con PEG determina en los protoplastos (Segmuller *et al.*, 2007). Es por esta razón que siempre se analizan varios mutantes independientes simultáneamente y se comprueba que el comportamiento de los mutantes analizados es similar.

Cuando se analizan los datos derivados del análisis de infección sobre judía los resultados obtenidos muestran una tendencia similar a la observada en tomate. Es decir, la media del tamaño de lesión en las cepas mutantes es mayor en las cuatro cepas mutantes que en la cepa silvestre. La tendencia es cierta, si bien las diferencias, según demuestra el análisis estadístico, no son significativas.

En conclusión, aunque los resultados no son claros sobre este segundo huésped, sí podemos decir que los mutantes $\Delta Bcmimp1$ parecen ser más agresivos sobre tomate y que la misma tendencia se observa sobre judía. Las diferencias en cuanto a la capacidad de colonización del tejido infectado a partir de las lesiones primarias no pueden ser atribuidas a una mayor capacidad de crecimiento per se de los mutantes, que en este trabajo hemos estimado mediante la evaluación de su capacidad de crecimiento saprofito en medios sintéticos y que ha resultado ser el mismo en la cepa de referencia y en las cepas mutantes. La mutación, por lo tanto, parece conferir cierta capacidad de crecimiento adicional o añadido solamente *in planta* (durante la interacción). Surge entonces la cuestión clave en relación con estas observaciones: ¿qué relación existe (puede existir) entre una alteración derivada de la eliminación de una proteína localizada en la mitocondria, concretamente en la membrana interna mitocondrial y con una función probablemente estructural cuya función depende en cierta medida, al menos, de la integridad de su extremo carboxilo, con un aumento de la agresividad sobre la planta huésped, en particular con su capacidad para colonizar los tejidos circundantes a las lesiones primarias?. Una revisión de la literatura científica en relación con alteraciones del metabolismo mitocondrial indica que, ya sean como consecuencia de mutaciones en genes nucleares que codifican productos de localización mitocondrial, ya sea por mutaciones en genes localizados en el propio genoma mitocondrial, éstas aparecen asociadas con distintos tipos de enfermedades y/o patologías en humanos (DiMauro y Schon, 2001; Wallace, 1999; Zeviani *et al.*, 2003). Son numerosas también las referencias que relacionan el metabolismo mitocondrial con el control de procesos celulares relacionados con el envejecimiento, la senescencia y la muerte celular programada (Green y Kroemer, 2004; Griffiths, 1992; Mignotte y Vayssiere, 1998; Zamzami *et al.*, 1997). Los modelos fúngicos están siendo utilizados ampliamente en el estudio de los procesos mencionados dada la facilidad de manejo de este grupo de organismos, la disponibilidad de un buen número de herramientas genéticas que facilitan la caracterización genética de estos sistemas y la elevada similitud entre las mitocondrias de humanos y hongos, en particular de *S. cerevisiae*, lo que permite estudios de genómica funcional que facilitan la identificación y el estudio de genes de humanos implicados en diversas patologías (Steinmetz *et al.*, 2002). El estudio de la base genética y fisiológica del envejecimiento también ha encontrado buenos sistemas modelo en hongos (Osiewacz, 2002). Una

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

de las principales consecuencias de alteraciones en el metabolismo mitocondrial es la producción de niveles anormalmente elevados de formas activas de oxígeno. Estas formas activas de oxígeno se producen de manera natural como consecuencia del “escape” de electrones que se produce en la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, electrones que escapan fundamentalmente a nivel de la ubiquinona. Estos electrones pueden reaccionar directamente con el O_2 molecular originando el radical superóxido (O_2^-), el cual puede ser dismutado originando H_2O_2 que puede a su vez reaccionar dando lugar al radical hidroxilo (OH^-) Revisado en (Cadenas y Davies, 2000). Se estima que en condiciones fisiológicas normales algo menos del 1% de los electrones movilizados a lo largo de la cadena de transporte de electrones se escapan de la cadena dando lugar a superóxido (Revisado en Raha y Robinson, 2000). Este escape natural puede aumentar muy significativamente cuando existen alteraciones funcionales o estructurales aguas abajo (principalmente en el complejo III) de la posición que ocupa la propia ubiquinona dando lugar a la formación de mayores niveles de formas activas de oxígeno que están relacionadas con procesos patológicos y con envejecimiento. También se producen niveles anormalmente elevados como consecuencia de alteraciones en el complejo I relacionados con la incorrecta transferencia de los electrones desde éste y hasta la ubiquinona (Raha y Robinson, 2000).

Dadas las características que hemos podido deducir del análisis llevado a cabo en este trabajo en relación con las características de la proteína BCMIMP1 es posible proponer que la mutación derivada de la eliminación de esta proteína pudiera determinar una alteración funcional de la mitocondria consecuencia de la incorrecta organización de la membrana interna mitocondrial o de alguno de los componentes necesarios para la correcta actividad mitocondrial. Si esta alteración afecta a la correcta transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones podríamos esperar, como consecuencia de la mutación, la producción de niveles elevados de formas activas de oxígeno en las cepas mutantes en comparación con la cepa silvestre. Diversos estudios indican que *B. cinerea* dispone de mecanismos que le permiten alterar el estado redox de la planta huésped y que esta alteración resulta útil para el patógeno como organismo necrotrofo que es ya que estos procesos determinan la muerte celular de las células que entran en contacto con el patógeno (Revisado en (Lyon *et al.*, 2004). Entre estos mecanismos destaca la capacidad de *B. cinerea* para inducir la muerte celular programada de las células de huésped y su capacidad para producir por sí mismo formas activas de oxígeno que resultan instrumentales para el patógeno en el contexto indicado (van Kan, 2006). Es decir, *B. cinerea* produce formas activas de oxígeno que contribuyen a acentuar la muerte celular de las células del huésped con las que entre en contacto el patógeno, facilitando así la penetración y el progreso de la infección. Si las cepas mutantes $\Delta Bcmimp1$ produjeran mayores niveles

de formas activas de oxígeno como consecuencia de una alteración de la actividad mitocondrial, podría explicarse de esta manera una mayor capacidad por parte de las cepas mutantes para infectar a la planta huésped, en particular para colonizar los tejidos adyacentes mediante la expansión de las lesiones dispersivas.

La mayor producción de formas activas de oxígeno en las cepas mutantes debería imponer una situación de estrés oxidativo en las células del propio patógeno. En este trabajo no hemos llegado a valorar esta posibilidad en las cepas mutantes de *B. cinerea*, pero esta consideración forma parte de las posibilidades de profundización en la caracterización del sistema que nos proponemos ampliar en el futuro. Disponemos de algunas evidencias preliminares que sugieren que en las cepas mutantes se están activando mecanismos que pudieran contrarrestar la situación de estrés oxidativo que es posible anticipar. En particular podemos indicar que en las cepas mutantes parece detectarse un aumento del nivel de expresión del gen *Bcaox1*, observación que, de ser confirmada, podría indicar que se están activando ramas alternativas de la cadena de transporte de electrones en estos mutantes, en particular aquella que involucra a la enzima oxidasa alternativa, enzima y ruta que puede desempeñar un papel de secuestrador de formas activas de oxígeno que podría minimizar localmente los daños derivados de la situación de estrés oxidativo inducida.

Debemos insistir en que no disponemos de evidencias experimentales que demuestren que esta hipótesis y explicación sean válidas. Sería posible considerar y argumentar otras posibilidades, también derivadas de la consideración de una posible alteración de la función mitocondrial. Y es que se reconoce que la membrana interna mitocondrial juega un papel fundamental en la modulación del flujo (y liberación) de citocromo c y de otros productos localizados en la mitocondria y hacia el citosol, y que el flujo de estos productos modula y controla a su vez el programa de muerte celular programada en mamíferos (Borner, 2003; Reed, 1998; Tsujimoto, 2003). Trabajos recientes demuestran que la maquinaria que controla la apoptosis en mamíferos está conservada en levaduras (Madeo *et al.*, 2002; Polcic y Forte, 2003; Smet *et al.*, 2004) y que la inducción o la prevención de la apoptosis en *Colletotrichum gloeosporioides* está estrechamente relacionada con el crecimiento, el desarrollo y la morfogénesis que tiene lugar durante el ciclo de vida del patógeno. En el contexto que nos ocupa es interesante destacar que los transformantes de *C. gloeosporioides* que expresan la proteína antiapoptótica Bcl-2 muestran, entre otras alteraciones fenotípicas, un fenotipo de hipervirulencia sobre la planta huésped (Barhoom y Sharon, 2007).

19.5 El gen Bde47B

Este trabajo se propuso también la identificación y el aislamiento del gen que codifica el segundo mensajero detectado con el fragmento de “differential display” ddB47, el gen que hemos denominado provisionalmente Bde47B. El interés del mismo reside en el hecho de que presenta también un patrón de expresión indicativo de expresión diferencial *in planta* que nos hace presuponer que el gen y su producto génico pueden participar en el proceso de infección. Para aislar el gen se han aplicado dos estrategias experimentales diferentes: una estrategia basada en procedimientos de hibridación utilizando como sonda el fragmento ddB47 y una aproximación bioinformática basada en el análisis el genoma de *B. cinerea* para identificar secuencias similares, pero no idénticas a la secuencia de dicho fragmento. Los resultados no han sido satisfactorios y no ha sido posible identificar el gen buscado.

Es necesario indicar que ninguna de las dos estrategias ha sido aplicada de manera exhaustiva y, por lo tanto, ninguna de las dos ha sido agotada en sus posibilidades. Los experimentos de hibridación permitieron identificar una serie de clones de fagos que hibridaban con la sonda indicada, pero la secuenciación de los clones detectados ha sido muy limitada. Los clones obtenidos se conservan para su futuro análisis.

Esta estrategia exigía una gran inversión de tiempo, esfuerzo y materiales, limitaciones que impedían completar el análisis de los materiales obtenidos en un periodo de tiempo razonable y que hicieron aconsejable una nueva aproximación experimental basada más en un análisis *in silico*. Un factor a tener en cuenta en este contexto es que durante el marco temporal en el que se procedió al análisis de este segundo gen, se hizo público el genoma de *B. cinerea* que la empresa Singenta había secuenciado un tiempo atrás. La disponibilidad de esta información nos animó a diseñar una estrategia alternativa sobre la que se centraron desde entonces nuestros esfuerzos.

Una vez aplicadas parcialmente ambas estrategias es interesante destacar que al menos en un caso ha sido posible llegar a identificar la misma secuencia mediante la secuenciación del clon de la genoteca detectado mediante hibridación y mediante el análisis *in silico* llevado a cabo. Es el caso del fragmento clonado en los plásmidos pDBP-6, pDBP-7 y pDBP-8 y de la secuencia de código 2266, que corresponde al gen BC1G_05413.1 en la anotación automática del genoma de *B. cinerea* cepa B05.10. Como indicábamos en la sección de resultados, aunque esta secuencia corresponde a un gen que podría codificar el RNA mensajero (atendiendo a criterios de tamaño de la región codificante) detectado mediante hibridación, no se detectó señal alguna de hibridación en la hibridación

northern llevada a cabo. Por lo tanto, el gen correspondiente no se expresa en esas condiciones, lo que nos obliga a descartarlo como candidato.

La secuenciación de clones de la genoteca ha sido, como indicamos, muy limitada. Nos descartamos, por lo tanto, que pudiéramos encontrar otros ejemplos adicionales de esta situación si aquella secuenciación hubiera sido más amplia. Esta es la situación que cabría esperar (que ambas estrategias permitieran identificar las mismas secuencias diana), ya que ambas estrategias se basan en última instancia en criterios de similitud. No obstante, analizando las informaciones que hemos obtenido hasta el momento derivadas de ambas estrategias podemos concluir, en una primera aproximación, que ambas aproximaciones son complementarias y que aún no hemos agotado las posibilidades de detección de una y otra.

En cualquier caso, son los experimentos de hibridación los que nos deben ofrecer una herramienta diagnóstica para identificar el gen Bde47B. Es decir, deberíamos reproducir con una sonda dada el patrón de hibridación detectado originalmente con la sonda ddB47 para el RNA mensajero de aproximadamente 1,0 kb para concluir que la nueva sonda deriva del gen buscado. Y no ha sido el caso con ninguna de las sondas utilizadas. Aunque hemos podido identificar varios genes, algunos de los cuales se expresan en las condiciones analizadas, ninguno corresponde al gen buscado.

No obstante, como consecuencia de los trabajos realizados en este contexto cabe destacar algunos resultados de interés. Quizás lo más significativo ha sido la identificación de un segundo gen nuclear que codifica también una proteína de localización mitocondrial, probablemente en la membrana interna, al igual que la proteína BCMIMP1. Y lo más destacable es que, al igual que el gen *Bcmimp1*, y aunque también se detecta expresión del mismo durante el crecimiento saprofítico (a las 16 horas de cultivo en medio mínimo líquido), su expresión parece ser inducida *in planta*, en este caso alcanzando el máximo de expresión a las 96 hpi. Este gen es el que corresponde a la secuencia utilizada como sonda con el código 2080 y en el genoma de *B. cinerea* corresponde al modelo de gen anotado automáticamente con el código BC1G_00665.1. Representaría el segundo gen de *B. cinerea* que codifica una proteína de localización mitocondrial y cuya expresión se induce *in planta*.

La proteína codificada por el gen BC1G_00665.1 presenta homología con la superfamilia de proteínas mitocondriales Pet127. La actividad de estas proteínas parece estar relacionada con la modulación de la actividad de una o más proteínas catalíticas con actividad exonucleolítica o endonucleolítica, además de estar implicada en la destrucción de RNAs mitocondriales inestables (Krause y Dieckmann, 2004). Estas proteínas están localizadas en la mitocondria y se encuentran unidas a la membrana y son necesarias para el procesamiento eficiente de diversos transcritos pre-

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

cursores (Wiesenberger y Fox, 1997). Sobre la función específica que la proteína correspondiente en *B. cinerea* pudiera desempeñar no hemos obtenido ninguna información, dado que no se trataba del gen buscado inicialmente y no hemos profundizado en su caracterización. No obstante constituye un buen candidato un análisis funcional detallado en el futuro.

Tampoco hemos profundizado en la caracterización del gen cuya expresión se detecta con la sonda Bot_37, cuya expresión parece mostrar un nivel importante de inducción *in planta* a las 96 hpi y a las 120 hpi. El gen correspondiente a esta sonda en el genoma de *B. cinerea* es el gen anotado automáticamente con el código BC1G_04929.1. La proteína codificada presenta homología con proteínas que forman parte de una familia proteica perteneciente a un grupo de enzimas encargadas de la organización y reorganización de la cromatina mediante cambios dinámicos gracias a la utilización de la energía proveniente de la hidrólisis de ATP. Gracias a estas proteínas la cromatina es reestructurada mediante cambios en los contactos entre histonas y el DNA (Smith *et al.*, 2005).

Cabe destacar en esta discusión el patrón de expresión del gen cuyo mensajero se detecta con la sonda de código 9100. El gen codificador correspondiente fue descartado ya desde un principio porque ciertamente es un gen que no muestra inducción *in planta*. Sin embargo, consideramos en estos momentos que su estudio pudiera resultar interesante ya que, no detectándose expresión alguna *in planta*, es posible asumir que su expresión es “apagada” al menos durante las fases de la interacción analizadas en este estudio. Por lo tanto, su expresión está regulada durante la interacción entre el patógeno y la planta huésped.

20. El gen derivado del cDNA ddB2

20.1. El gen Bde2

El gen Bde2, redominado *Bctc1*, es el gen que codifica el RNA mensajero detectado en nuestro análisis de expresión génica diferencial y a partir del cual se generó el fragmento de cDNA ddB2. Como se puede ver en la sección de resultados, su RNA mensajero parece detectarse únicamente durante las fases más tardías del proceso de infección, es decir durante la colonización y maceración del tejido infectado. Mediante hibridación Northern no ha sido posible detectar expresión de *Bctc1* en otras fases del proceso de infección ni durante el cultivo en medio líquido a las 16 h de crecimiento. En este caso, por lo tanto, y en principio, podríamos hablar de un gen cuya expresión es inducida *in planta* o de un gen expresado diferencialmente *in planta*. No obstante, en nuestra opinión el hecho de que no haya sido posible detectar su expresión durante otras fases del proceso de infección ni durante el cultivo saprofito en medio líquido medio no implica que el gen no se esté expresando en absoluto en esas fases o en esas condiciones. Es posible que se pueda estar expresando en algunas fases o en algunas condiciones, aunque a niveles no detectables mediante hibridación northern.

Como en los casos anteriores, la identificación de la copia genómica del gen y de la fase de lectura correspondiente sólo ha sido posible una vez se han tenido en cuenta las diversas fuentes de información a nuestra disposición, como eran la secuenciación propia de fagos de la genoteca de *B. cinerea* en EMBL3 y las secuencias del genoma de *B. cinerea* y de otros hongos. El estudio de la secuencia detectada y secuenciada y la comparación con el genoma de *B. cinerea*, así como con el genoma de *S. Sclerotium* (ascomicete estrechamente relacionado filogenéticamente con *B. cinerea*), nos permite asegurar que estamos razonablemente seguros de que hemos identificado la fase de lectura correcta y la estructura del gen en cuestión.

A pesar de conocer la secuencia del gen *Bctc1*, la información derivada de la comparación con secuencias depositadas en bases de datos ha resultado de una utilidad limitada. La búsqueda de homología con genes previamente caracterizados en otros organismos nos ha dado homologías no muy elevadas y las mayores similitudes se detectan con genes de hongos no caracterizados funcionalmente, por lo que no ha resultado sencillo extraer información de estudios comparativos. Por

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

esta razón, para deducir y proponer cuál es la función del gen y de la proteína deducida tenemos que basarnos, y esta ha sido nuestra principal fuente de información, en el análisis bioinformático.

El análisis bioinformático de la secuencia de nucleótidos del gen *Bctc1* y la comparación de la secuencia proteica derivada del mismo, BCTP1, en busca de proteínas homólogas mediante el algoritmo BLASTp y la búsqueda de dominios funcionales con el algoritmo CPD (ver sección 16.6 de Resultados) nos hizo concluir que estamos ante una proteína homóloga a ciclinas reguladoras de la transcripción, en concreto con ciclinas de tipo C y tipo K.

Además del análisis bioinformático hemos intentado llevar a cabo un análisis funcional mediante la obtención de mutantes por reemplazamiento génico de este gen. Este análisis funcional ha generado resultados que indican que el gen es esencial, ya que ha resultado imposible hasta el momento obtener mutantes en los que la copia silvestre del gen haya sido eliminada. La estrategia de reemplazamiento génico aplicada es esencialmente la misma que la que se ha utilizado en el caso del gen *Bcmimp1*, y se han analizado incluso más transformantes primarios que en aquel caso. Sin embargo, a pesar de haber obtenido un buen número de candidatos portadores de núcleos en los que ha tenido lugar el reemplazamiento génico, en ningún caso ha sido posible obtener un cultivo monospórico derivado de un transformante portador del alelo mutante en homocariosis. Dada la experiencia acumulada en nuestro laboratorio y las informaciones de las que disponemos sobre los trabajos llevados a cabo en otros laboratorios, creemos que el hecho de que no hayamos encontrado la cepa mutante es consecuencia del carácter esencial del producto del gen *Bctc1*.

Partiendo de la premisa de que el gen es esencial, cabe discutir el por qué de la no detección de su expresión durante el crecimiento saprofito en las condiciones analizadas ni durante la interacción con la planta en las fases analizadas. Creemos que el gen es, efectivamente, esencial y que si no hemos detectado su expresión al menos durante el crecimiento saprofito en medio líquido es porque su nivel de expresión en esas condiciones está por debajo del límite de sensibilidad de la hibridación northern. No puede descartarse que el gen se exprese en condiciones o en fases del ciclo de vida y de infección no analizadas en este trabajo.

20.2. Ciclinas reguladoras de la transcripción

Las ciclinas fueron descubiertas como proteínas cuya acumulación durante la interfase y destrucción en la mitosis jugaba un papel crítico en la progresión del ciclo celular en eucariotas (Murray, 2004). Estas proteínas, cuya cantidad se incrementa durante la interfase y que bruscamente se reduce en cada mitosis (Evans *et al.*, 1983), controlan el ciclo celular uniéndose a kinasas dependientes de ci-

clina (CDKs) y regulando su actividad (Malumbres y Barbacid, 2005; Murray, 2004). Comprenden una gran familia de proteínas altamente conservadas en su función en muchos organismos, desde levaduras hasta mamíferos (Andrews y Measday, 1998), y desde que se descubrieran y se identificaran, diversas CDKs y ciclinas han sido caracterizadas. Muchas de estas ciclinas y CDKs han sido aisladas debido a su habilidad de rescatar mutaciones en sus homólogos en levaduras (Elledge y Spottswod, 1991; Lee y Nurse, 1987; Lew *et al.*, 1991; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1991) o por similitud en sus secuencias (Meyerson *et al.*, 1992).

Aunque, originalmente identificadas como proteínas implicadas de manera importante en la regulación del ciclo celular, existen combinaciones ciclina-CDK que participan aparentemente en otros procesos celulares no relacionados (Feaver *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1995; Maldonado *et al.*, 1996; Rickert *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1994; Tassan *et al.*, 1995).

CICLINA	CDK asociada	Proceso regulado
A1,A2	CDK1	Ciclo celular (G2-M)
	CDK2	Ciclo celular (G1-S)
B1, B2	CDK1	Ciclo celular (G2-M)
D1, D2, D3	CDK4, CDK5, CDK6	Ciclo celular (G1-S)
E1, E2,	CDK2, CDK5	Ciclo celular (G1-S)
L1, L2	CDK 11	Transcripción, Ciclo celular (M)
C	CDK8, CDK3	Transcripción (Componente de la holoenzima RNA pol II)
H	CDK7	Transcripción (Subunidad del factor reparador de la transcripción TFIIH)
K	CDK9	Transcripción, respuesta a estrés, desarrollo
T1, T2a, T2b	CDK9	Transcripción (Componentes de la holoenzima RNA pol II)
G1, G2	?	Grupo 3
I	?	Grupo 3

Tabla 19.I

Ciclinas más relevantes encontradas en mamíferos

Las ciclinas pueden ser divididas en tres grandes grupos que resumen su función *in vivo*. El primer grupo consiste en las ciclinas A, B, D1, D2, D3, E y F, cuya función está demostrada en la regulación del ciclo celular. El grupo II consistiría en las ciclinas C, H y K, que tienen papeles en la regulación de la transcripción. Un tercer grupo consistiría de las ciclinas G1, G2 y I con papeles distintos tanto del ciclo celular como de la regulación transcripcional (Bates *et al.*, 1996). Las ciclinas

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

de tipo C están involucradas en la activación de la transcripción o la represión de genes asociados con respuestas a estrés o desarrollo (Cooper *et al.*, 1997; Kuchin *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1995).

La síntesis de RNA mensajero en eucariotas es un proceso bioquímico complejo que está regido por la acción de diversos factores de transcripción que controlan la actividad de la RNA polimerasa II (RNA pol II) durante las fases de inicio y elongación de la transcripción. La RNA polimerasa II es un complejo holoenzimático grande y estable compuesto por las subunidades de la RNA polimerasa II, un conjunto de factores generales de transcripción (TFIIB, TFIIF y TFIIH) y un grupo de proteínas (SRBs) que funcionan como mediadores entre la RNA pol II y los factores de transcripción. La transcripción se inicia cuando la RNA pol II se acopla a los cinco factores de iniciación (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH) formándose un complejo de pre-iniciación a la altura del promotor. Una vez comenzada la transcripción, la RNA pol II se distancia del promotor y se disocia de algunos de los factores de iniciación, paso que da lugar al comienzo de la fase de elongación. Esta fase de elongación está regulada por factores de elongación de la transcripción que interactúan directamente con el complejo formado por la holoenzima. Existen dos clases de factores de elongación: de acción positiva, P-TEFb (positive transcription elongation factor), y de acción negativa, N-TEFs (Negative transcription elongation factors) y DSIF (DRB-sensitivity-inducing factor) (Conaway *et al.*, 2000).

P-TEFb es un complejo regulador que está compuesto por la CDK9 y diversas ciclinas (T1, T2 y K) (Fu *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1998). Este complejo enzimático Ciclina-CDK regula la RNAPolII mediante la fosforilación del dominio Carboxi-Terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA pol II (Bartolomei *et al.*, 1988; Nonet *et al.*, 1987; Zehring *et al.*, 1988), que consiste en la repetición consecutiva de un heptapéptido (Dahmus, 1996; Orphanides *et al.*, 1996) evitando la parada de la elongación mediante el bloqueo de las uniones de DSIF y NELF con el complejo de elongación. Una vez la RNA polimerasa II comienza la elongación propiamente dicha, la eficiencia de esta puede estar influenciada por factores adicionales (S-II, TFIIF, ELL y elonguina) (Shilatifard, 1998; Uptain *et al.*, 1997; Wind y Reines, 2000).

20.3. Ciclinas de tipo C

Las ciclinas de tipo C encontradas en humano y en *Drosophila* fueron identificadas gracias a su capacidad de rescatar cepas mutantes de *S. cerevisiae* con su ciclo celular detenido al no poseer ciclinas G1 (Lahue *et al.*, 1991; Léopold y O'Farrell, 1991; Lew *et al.*, 1991). Este grupo de proteínas comparten secuencias similares y parecen estar implicadas en la iniciación de la transcripción de la

RNA pol II (Liao *et al.*, 1995) y en la activación de otras CDK a través de su fosforilación (actividad CAK) (Kaldis *et al.*, 1996). Al contrario que otras ciclinas reguladoras del ciclo celular, el RNA mensajero y los niveles de proteína de las ciclinas de tipo C no fluctúan durante la división mitótica de la célula (Cooper *et al.*, 1997).

Las ciclinas C contienen tres regiones conservadas muy importantes para su función: “cyclin box motif”, “PEST-rich motif” y “destruction box-like motif” (Cooper *et al.*, 1997; Kuchin *et al.*, 1995). El dominio “cyclin box motif” es necesario para la interacción y activación de las CDK asociadas. Este motivo contiene una región que confiere especificidad en la unión con la CDK (Pines, 1993), aunque no parece estar implicado en los cambios reguladores de la proteína. Las regiones ricas en Prolina, Glutámico, Serina y Treonina (PEST-rich motif) son necesarias para el cambio rápido en las ciclinas de G1 (Salama *et al.*, 1994; Tyers *et al.*, 1992) así como en otras moléculas reguladoras (Kornitzer *et al.*, 1994). La secuencia denominada “destruction box-like motif” (RQKL) es requerida para la degradación de las ciclina en respuesta a estímulos externos, tales como el choque térmico (Cooper *et al.*, 1997). Este motivo es similar a la secuencia requerida para la degradación vía ubiquitina de las ciclinas de fase G2 (Glutzer *et al.*, 1991).

El estudio de la secuencia de BCTC1 de *B. cinerea* en busca de dominios característicos para esta familia de ciclinas sólo pudo verificar la presencia de dominio CAK, pero sin contener el dominio “destruction box-like motif”. Al contrario que en *Fusarium*, la proteína BCTC1 de *B. cinerea* sólo presenta uno de los tres dominios característicos de este tipo de ciclinas, el dominio “cyclin box” (ver sección de Resultados 16.7), por lo que inicialmente no podemos asegurar con certeza que el gen *Bctc1* codifique para una ciclina C, pero sí para una ciclina relacionada con transcripción, es decir, una ciclina C o K.

20.4. Ciclinas de tipo K

Por otro lado, a pesar de que las homologías más significativas decantan la balanza hacia la suposición que el gen *Bctc1* codifica para una ciclina de tipo C, en nuestra búsqueda de homologías, las ciclinas de tipo K hicieron su aparición con unos e-valores que no podían ser ignorados, por lo que también mantuvimos abierta la opción de que nuestro gen pudiera estar codificando una ciclina de tipo K.

Las ciclinas de tipo K están clasificadas como un miembro de la familia de ciclinas transcripcionales, y descubiertas por su capacidad de rescatar el ciclo celular a *S. pombe*, al igual que las ciclinas C. La ciclina K humana comparte una identidad del 22% con las ciclinas C (Edwards *et*

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

al., 1998) y la estructura secundaria y la topología de la ciclina K en humanos es similar a la de la ciclina C de *S. pombe* (Baek *et al.*, 2007). BTC1 presenta una identidad aproximada del 30 % con ciclinas de tipo K de diversos organismos.

Junto a las ciclinas T1, T2a y T2b, la ciclina K interactúa con la CDK9 formando parte del complejo nuclear P-TEFb, regulando la elongación de la transcripción de genes específicos que juegan un papel central en la fisiología humana y el desarrollo de patologías. Una característica importante es que el gen que codifica para la ciclina K se activa transcripcionalmente por el supresor tumoral p53 en respuesta a estrés genotóxico (Mori *et al.*, 2002). Además de su función reguladora, la kinasa asociada a la ciclina K, CDK9, fosforila la pareja CDK2-ciclina A (actividad CAK). BCTC1 presenta los motivos “cyclin box” y la región que le da actividad CAK. La asociación de las dos isoformas de CDK9 con ciclinas K, T1, T2a y T2b genera la formación de 8 posibles complejos P-TEFb distintos tanto estructuralmente como funcionalmente. Estos complejos, que presentan diferencias de secuencia entre las distintas proteínas asociadas, presentan distintas funciones especializadas del P-TEFb en el control transcripcional de genes específicos (Barboric y Peterlin, 2005; Garriga y Grana, 2004). Gracias a estas interacciones, distintas especies de P-TEFb regulan redes genómicas específicas y participan en el control de crecimiento celular, proliferación, diferenciación, apoptosis y patogénesis.

A pesar de que se conoce todavía menos de las ciclinas K que de las ciclinas C, las evidencias obtenidas en nuestro análisis bioinformático y de dominios funcionales indican que nuestra proteína BCTC1 podría ser la primera ciclina de tipo K descrita en hongos filamentosos.

BCTC1, como componente de la familia de ciclinas reguladoras de la transcripción, debe de estar jugando un papel en la regulación de la RNA pol II y, por consiguiente, controlar la expresión o inhibición de diversos genes. Estos genes regulados pudieran estar relacionados con la patogénesis y con otras funciones metabólicas. En nuestro caso, BCTC1 bien pudiera estar regulando en *B. cinerea* rutas metabólicas principales, y, por tanto, esenciales, ya que su mutación es letal, como se ha mencionado anteriormente. No podemos descartar que BCTC1 también pudiera estar regulando, al mismo tiempo, genes activados específicamente durante la interacción con tomate, como demuestra su patrón de expresión (ver sección 6.15.a). Este gen podría estar controlando la expresión de proteínas que jueguen un papel importante tanto en el metabolismo principal como durante la infección. La expresión diferencial de este gen, durante las fases tardías del proceso de infección, podría indicar que la transcripción de algunos genes involucrados en los mecanismos de patogénesis de *B. cinerea* está siendo mayor porque son necesarios en estas fases. La cuestión fundamental, que por el momento no se puede contestar, es si la maquinaria transcripcional regulada por el gen *Bctc1*

está afectando a genes que juegan un papel tanto en metabolismo basal como durante el proceso infeccioso, o si son distintos genes involucrados en diferentes procesos que están siendo regulados por el mismo complejo regulador.

20.5. Las ciclinas de tipo C y la respuesta al estrés oxidativo

Además de su función reguladora a nivel transcripcional, parece que la ciclina de tipo C esté jugando otro papel en los sistemas reguladores del estrés oxidativo (Santoro y Thiele, 1997) relacionados con H_2O_2 y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Como se ha descrito anteriormente, durante el proceso patogénico de *B. cinerea*, las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante (Tudzynski y Kokkelink, 2009; von Tiedemann, 1997). Las moléculas biológicas que actúan como antioxidantes secuestrando estos radicales libres, normalmente coexisten en equilibrio con las ROS generadas por el metabolismo celular (Gaté *et al.*, 1999). El daño oxidativo agudo, normalmente denominado estrés oxidativo, ocurre cuando este equilibrio desaparece por la intervención de compuestos, como metales pesados o de H_2O_2 , que estimulan la producción de radicales libres. Existe una gran cantidad de ROS (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogeno, etc.) que pueden dañar diversos componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Woodford *et al.*, 1995). Como respuesta a este estrés oxidativo, existen genes que codifican para moléculas antioxidantes o quelantes de radicales libres que contrarrestan los efectos de estas moléculas. Las células pueden responder a este estrés oxidativo suspendiendo el ciclo celular hasta que el daño esté reparado. Por el contrario, el daño oxidativo puede activar la muerte celular programada (apoptosis) (Jiang y Wang, 2004), proceso altamente conservado en la mayoría de los organismos, desde hongos hasta mamíferos (Skulachev, 2002), y que *B. cinerea* puede utilizar a su favor (Dickman *et al.*, 2001).

En levaduras, la inducción de genes de respuesta al estrés oxidativo requiere la activación de factores de transcripción (Liu y Thiele, 1996) que actúan como efectores de la red de señales de transducción que transmiten una señal particular al núcleo (Gustin *et al.*, 1998). Además de la activación de los factores de transcripción, la ciclina C y su CDK asociada (CDK8) efectúan una represión transcripcional (Surosky *et al.*, 1994), uniéndose a la holoenzima RNA polimerasa II, e inhibiendo la transcripción de diversos genes de respuesta al estrés (Cooper *et al.*, 1997; Holstege *et al.*, 1998). La eliminación de la función represora, mediante la destrucción de la ciclina C, es necesaria para que la inducción génica mediada por estímulos causantes de estrés, como son el estrés oxidativo y el shock térmico, sea llevada a cabo. Así ocurre con UME3P, una ciclina tipo C de *S.*

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

cerevisiae, cuya degradación, a través de la señal de destrucción de la caja ciclina, es inducida por H_2O_2 (Cooper *et al.*, 1997). Por consiguiente, la destrucción de la ciclina C es un factor importante en la ruta de respuesta al estrés oxidativo, ya que su degradación protege la célula de la acción de las ROS, al liberar la síntesis de moléculas antioxidantes. Que el gen *Bctc1* se esté expresando a niveles mayores durante la fase de colonización y maceración del tejido infectado, y no durante las fases de expansión de las lesiones primarias (fases donde se observa una producción significativa de H_2O_2 por la planta (Greenberg, 2003; Hutcheson, 1998), nos puede indicar que el gen *Bctc1* se está expresando solamente en las fases donde los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo están inhibidos.

Este tipo de respuesta parece comportarse de la misma manera que la tolerancia adquirida de la célula cuando se enfrenta a condiciones tóxicas (Lindquist y Kim, 1996) y la resistencia a apoptosis estimulada por el aumento en la expresión de proteínas de choque térmico (Samali y Cotter, 1996).

Sorprendentemente, la delección de la CDK8, parece no afectar a la sensibilidad frente H_2O_2 de *S. cerevisiae*. Esto pone sobre la mesa nuevas hipótesis que sugieren la posibilidad de que la ciclina se esté uniendo a otra CDK asociada y que responda a estímulos externos y regule la transcripción, o bien pudiera estar llevando a cabo su función dentro del mecanismo de respuesta al H_2O_2 en el citoplasma independientemente de la función represora de la transcripción que ocurre en el núcleo, como ocurre con la ciclina C humana cuando es estudiada en levadura. Estas observaciones dan a entender que la ciclina C puede estar controlando la sensibilidad frente a ROS independientemente de su papel como represor transcripcional (Krasley *et al.*, 2006).

En hongos ascomicetes fitopatógenos, donde se empiezan a describir genes parecidos a ciclinas de tipo C, estas proteínas parecen jugar un papel importante en la regulación del desarrollo, como la conidiación, y de rutas metabólicas secundarias, como la biosíntesis de micotoxinas. (Shim y Woloshuk, 2001), así como en procesos de infección (Zhou *et al.*, 2009). Además de su posible función esencial en la regulación de la transcripción de *B. cinerea*, el gen *Bctc1*, como ocurre en *Fusarium verticilloides* (Zhou *et al.*, 2009), pudiera también regular otras rutas metabólicas secundarias de producción de metabolitos secundarios utilizados como micotoxinas durante el proceso infeccioso, como es el botridiol.

En estos hongos, *F. verticilloides* y *F. graminearum*, la delección de los genes para estas proteínas similares a ciclinas C (FCC1, CID1) no parecen ser letales, por lo que se puede asegurar que no son genes esenciales, aunque sí se han descrito alteraciones fenotípicas, como una disminución del crecimiento. Hasta donde nuestro estudio de la ciclina BCTC1 de *B. cinerea* ha llegado, podemos

asegurar que *Bctc1* es esencial, en contra de lo que se pudiera pensar al estudiar los genes de *Fusarium* homólogos a ciclina C. Ambos genes del género *Fusarium*, *Fcc1* y *Cid1*, son homólogos al gen *Ume3p* de *S. cerevisiae*, necesario para la regulación negativa de genes involucrados en meiosis, respuesta a estrés (Kuchin *et al.*, 1995) y otros procesos metabólicos (Ansari *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2003; Cooper y Strich, 2002). La delección de estos genes puede resultar en la anulación de la represión de genes que normalmente estén reprimidos, dando lugar a una transcripción anormal o desequilibrada de diferentes genes que afecten a la fisiología normal del organismo, o bien pudieran bloquear totalmente la fase de elongación en la transcripción, afectando a todo el metabolismo celular de una manera fatal, lo que pudiera justificar las observaciones en *B. cinerea* (el hecho de que sea letal). A pesar del alto grado de conservación de estas proteínas, no todas actúan de la misma manera y, dependiendo de cada organismo, pueden estar relacionadas con un mayor o menor número de funciones de mayor o menor importancia que varíen en cada organismo. Por ejemplo, *Cid1* es el primer gen descrito de este tipo que es importante en la interacción planta-patógeno, mientras que su homólogo, *Fcc1*, no parece estar relacionado con patogénesis; y aunque la delección de *Ume3* de *S. cerevisiae* no sea letal (Cohen *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 1997), los genes *mcs21* y *pch11*, codificantes de ciclinas tipo C en *S. pombe*, sí son esenciales (Furnari *et al.*, 1997; Molz y Beach, 1992). Como podemos ver, esta familia de ciclinas, aunque altamente conservada, muestran una gran diversidad funcional y metabólica, lo que refuerza la hipótesis de que el gen de *Bctc1* perteneciente a *B. cinerea* pudiera ser otro gen codificador de ciclinas de tipo C esencial.

No obstante, cabe indicar que todas estas conjeturas se basan únicamente en el análisis bioinformático del gen *Bctc1* y su comparación en busca de homólogos en bases de datos. A pesar de no tener pruebas experimentales que nos indiquen la función que tiene en el metabolismo de *B. cinerea*, no descartamos continuar con su estudio y caracterización.

21. Consideraciones finales

Como hemos podido ver a lo largo de este trabajo, los genes Bde47A (*Bcmimp1*) y Bde2 (*Bctc1*) muestran un patrón de expresión que nos permite asumir su participación en procesos o mecanismos importantes para que la infección de la planta huésped tenga lugar. La caracterización llevada a cabo indica que ninguno de estos dos genes es un “factor de patogenicidad” en el sentido estricto del término, ya que su eliminación no determina una alteración de la capacidad del patógeno para infectar al huésped. No obstante, los resultados derivados de este trabajo nos proporcionan información relevante sobre el estado fisiológico del patógeno *in planta*. Es posible concluir que a la hora de analizar el proceso de infección debemos tener en cuenta posibles modificaciones del metabolismo mitocondrial que el hongo experimenta *in planta*, así como posibles cambios en la regulación de la transcripción que el hongo también puede experimentar durante la interacción con su huésped. Fruto del trabajo y de las observaciones realizadas proponemos que el hongo se adapta a las condiciones que le impone el crecimiento sobre el huésped y que esta adaptación probablemente exige una acomodación del metabolismo mitocondrial a los requerimientos que dicho crecimiento *in planta* plantea. Esta situación muy probablemente exige también una modulación de los niveles de transcripción de numerosos genes que, actuando de manera coordinada, facilitan la supervivencia del patógeno sobre el huésped. Es interesante destacar que, a la luz de los resultados generados, la revisión de la literatura científica en aspectos relacionados con los dos genes estudiados y sus funciones biológicas nos permite encontrar puntos y elementos de convergencia ciertamente interesantes. En ambos casos nos encontramos con el problema del estrés oxidativo y con la consideración del modo en el que los sistemas vivos manejan las formas activas de oxígeno con las que forzosamente tienen que convivir.

Aunque se haya caracterizado un buen número de genes con diversas funciones biológicas y bioquímicas que están relacionadas con la patogenicidad de *B. cinerea*, además de genes relacionados con rutas de señalización conservadas, los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis en *B. cinerea* se muestran complejos y todavía estamos lejos de entenderlos en su totalidad.

Creemos que el trabajo realizado en este estudio ilustra esta situación y constituye una modesta contribución a la caracterización de un sistema ciertamente complejo. La capacidad del patógeno para infectar a su huésped y los factores que poco a poco vamos caracterizando forman parte de un complejo sistema del que todavía no hemos vislumbrado más que un tembloroso boceto.

Conclusiones

Las conclusiones de la presente tesis doctoral se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. El fragmento de “differential display” ddB47 detecta dos RNA mensajeros generados por dos genes diferentes. El RNA mensajero de 1,4 kb resulta de la transcripción del gen *Bcmimp1*, de copia única en el genoma de *B. cinerea*.
2. La expresión del gen *Bcmimp1* está regulada tanto durante el crecimiento saprofitico como durante la interacción con la planta huésped. Durante el crecimiento saprofitico en medio sintético líquido la expresión es mayor durante la fase de germinación de las esporas y de emisión de los tubos germinativos, disminuyendo durante la fase de extensión y elongación del micelio. *In planta*, *Bcmimp1* muestra un patrón de expresión transitoria, siendo máxima durante las fases de penetración, de expansión de las lesiones dispersivas y de colonización y maceración del tejido infectado y mostrando niveles basales durante la fase de latencia, a las 32 hpi, cuando la planta parece ser capaz de controlar la infección, y a las 96 hpi, cuando el patógeno ha podido vencer las barreras defensivas de la planta en las lesiones dispersivas y antes de colonizar todo el tejido infectado.
3. El gen *Bcmimp1* codifica una proteína estructural localizada en la membrana interna de la mitocondria.
4. La eliminación de la proteína BCMIMP1 no produce diferencias fenotípicas evidentes durante el crecimiento saprofitico de *B. cinerea*. En cambio, sí determina diferencias en su capacidad de infección y colonización *in planta*. Sorprendentemente, los mutantes carentes del gen *Bcmimp1* muestran un aumento de su capacidad para infectar a la planta huésped.
5. Podemos argumentar que la proteína BCMIMP1 está relacionada con el metabolismo mitocondrial y que su eliminación conduce a una desorganización de la membrana mitocondrial que determina un fenotipo de mayor virulencia *in planta*.
6. Las distintas aproximaciones experimentales empleadas en este trabajo con el objeto de identificar y aislar el gen que codifica el RNA mensajero de aproximadamente 1,0 kb de tamaño

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

detectado también con el fragmento de “differential display” ddB47 han resultado infructuosas. Se ha comprobado que el genoma de *B. cinerea* presenta numerosas regiones ricas en los nucleótidos de Adenina y de Guanina con una organización de tipo microsatélite, algunas de las cuales corresponden a la región estructural de genes que son transcritos en las condiciones experimentales investigadas en este trabajo. Ninguna de las secuencias analizadas en este trabajo corresponde al gen Bde47B.

7. El fragmento de “differential display” ddB2 detecta un RNA mensajero codificado por el gen de copia única *Bctc1*.
8. El gen *Bctc1* se expresa a niveles detectables mediante hibridación Northern únicamente durante la interacción del patógeno con su planta huésped y en fases muy definidas de la misma, concretamente durante los estadios más tardíos del proceso de infección, correspondientes a las fases de colonización y de maceración del tejido infectado.
9. El gen *Bctc1* codifica una proteína de tipo ciclina, que presenta homología con ciclinas de tipo C y K, relacionadas con la regulación de la transcripción.
10. La eliminación del gen *Bctc1* resulta letal en *B. cinerea*, lo que supone que el gen es esencial en este organismo.
11. Tomadas en conjunto, las observaciones derivadas del análisis de expresión y del análisis funcional de los genes *Bcmimp1* y *Bctc1* llevados a cabo en este trabajo sugieren que la adaptación del patógeno a una situación de interacción con el huésped determina la modulación, por una parte, de la actividad mitocondrial en las distintas fases del proceso de infección y, por otra, de la transcripción de una proteína tipo ciclina probablemente implicada en el control de la transcripción de otros genes.

Bibliografía



- Agüero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. L. T., Labavitch, J. M., Meredith, C. P., and Dandekar, A. M.** (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* 6, 43-51.
- Akutsu, K., Y. K., Matsuzawa, Y., Watanabe, T., Ko, K., and Misatao, T.** (1981). Morphological studies on infection process of cucumber leaves by of *Botrytis cinerea* stimulated with arious purine-related compounds. . *Annals of the Phytipathological Society of Japan* 47.
- Alfonso, C., Raposo, R., and Melgarejo, P.** (2000). Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49, 243-251.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koese-
ma, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt,
M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I.,
Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand,
T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., and Ecker, J. R.** (2003). Genome-Wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Andrews, B., and Measday, V.** (1998). The cyclin family of budding yeast:abundant use of a good idea. *Trends in Genetics* 14, 66-72.
- Ansari, A. Z., Ogirala, A., and Ptashne, M.** (2005). Transcriptional activating regions target attached substrates to a cyclin-dependent kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2346-2349.
- Backhouse, D., and Willetts, H. J.** (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology* 30, 171-178
- Baek, K., Brown, R. S., Birrane, G., and Ladias, J. A. A.** (2007). Crystal structure of human cyclin K, a positive regulator of cyclin-dependent kinase 9. *Journal of Molecular Biology* 366, 563-573.
- Balhadère, P. V., Foster, A. J., and Talbot, N. J.** (2007). Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 129-142.
- Barboric, M., and Peterlin, B. M.** (2005). A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biology* 3, e76.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Bardas, G. A., Myresiotis, C. K., and Karaoglanidis, G. S.** (2008). Stability and fitness of anilino-pyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 98, 443-450.
- Barhoom, S., and Sharon, A.** (2007). Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genetics and Biology* 44, 32-43.
- Barkai-Golan, R., Lavy-Meir, G., and Kopeliovitch, E.** (1988). Pectolytic and cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* Pers. related to infection of non-ripening tomato mutants. *Journal of Phytopathology* 123, 174-183.
- Barloy, J., and Pelhate, J.** (1962). Premières observations phytopathologiques relatives aux cultures de chanvre en Anjou. *Annales des Epiphyties* 13, 117-149.
- Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R., and Corden, J. L.** (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Molecular and Cellulat Biology* 8, 330-339.
- Bates, S., Rowan, S., and Vousden, K. H.** (1996). Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes. *Oncogene* 13, 1103-1109.
- Beever, R. E., and Weeds, P. L.** (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 29-52. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Benito, E. P., Prins, T., and van Kan, J. A. L.** (1996). Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Molecular Biology* 32, 947-957.
- Benito, E. P., ten Have, A., van 't Klooster, J. W., and van Kan, J. A. L.** (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European journal of plant pathology* 104, 207-220.
- Berget, S. M.** (1984). Are U4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation? *Nature* 309, 179-182.
- Berrie, A. M., Harris, D. C., Xu, X.-M., and Burgess, C. M.** (2000). A potencial system for managing *Botrytis* and powdery midew in main season strawberries. *Acta Horticulturae* 567, 647-649.
- Berthold, D. A., Andersson, M. E., and Nordlund, P.** (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1460, 241-254.
- Biemelt, S., and Sonnewald, U.** (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 163, 307-318.

- Bilu, A., Dag, A., Elad, Y., and Shafir, S.** (2004). Honey bee dispersal of biocontrol agents: An evaluation of dispensing devices. *Biocontrol Science and Technology* 14, 607-617.
- Blakeman, J. P.** (1980). Behavior of conidia on aerial plant surfaces. In "The biology of *Botrytis*" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds.), pp. 115-151. Academic Press, London.
- Borner, C.** (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology* 39, 615-647.
- Braumann, I., van den Berg, M., and Kempken, F.** (2008). Repeat induced point mutation in two asexual fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Current Genetics* 53, 287-297.
- Brito, N., Espino, J. J., and González, C.** (2006). The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 25-32.
- Broome, J. C., English, J. T., Marois, J. J., Latorre, B. A., and Aviles, J. C.** (1995). Development of an infection model for botrytis bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. *Phytopathology* 85, 97-102.
- Burgess, D. R., Bretag, T., and Keane, P. J.** (1997a). Biocontrol of seedborne *Botrytis cinerea* in chickpea with *Gliocladium roseum*. *Plant Pathology* 46, 298-305.
- Burgess, D. R., Bretag, T., and Keane, P. J.** (1997b). Seed-to-seedling transmission of *Botrytis cinerea* in chickpea and disinfestation of seed with moist heat. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37, 223-229.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaiich, R., Brückner, B., and Tudzynski, P.** (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25, 445-450.
- Cadenas, E., and Davies, K. J. A.** (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 222-230.
- Calvo, J., Calvente, V., Orellano, M., Benuzzi, D., and Sanz, M.** (2008). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple fruit by mixtures of bacteria and yeast. *Food and Bioprocess Technology*.
- Carlson, J. A.** (1986). *Botrytis cinerea* Pers. on conifer seedlings in British Columbia container nurseries - A review, (Thesis - Master of Pest Management) Simon Fraser University.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T.** (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933-2942.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Catlett, N. L., Yoder, O. C., and Turgeon, B. G.** (2003). Whole genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryotic Cell* 2, 1151-1161.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., and Low, P. S.** (2000). Oxalic Acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12, 2191-2200.
- Clark, C. A., and Lorbeer, J. W.** (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* 66, 1279-1289.
- Cohen, T. J., Lee, K., Rutkowski, L. H., and Strich, R.** (2003). Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p. *Eukaryotic Cell* 2, 962-970.
- Cole, L., Dewey, F. M., and Hawes, C. R.** (1996). Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100, 277-286.
- Colmenares, A. J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Collado, I. G., and Hernández-Galán, R.** (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* 28, 997-1005.
- Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R. C.** (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 375-380.
- Cooper, K. F., Mallory, M. J., Smith, J. B., and Strich, R.** (1997). Stress and developmental regulation of the yeast C-type cyclin Ume3p (Srb11p/Ssn8p). *EMBO Journal* 16, 4665-4675.
- Cooper, K. F., and Strich, R.** (2002). *Saccharomyces cerevisiae* C-Type cyclin Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development. *Eukaryotic Cell* 1, 66-74.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A. R., Falkow, S., and Brown, A. J. P.** (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 303-311.
- Coyier, D. L.** (1985). Roses. In "Diseases of Floral Crops" (D. L. Strider, ed.), Vol. 1, pp. 405 - 488. Praeger Publisher, New York.
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., Weeds, P. L., and Templeton, M. D.** (2002). An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*, 187-198.

- Chagué, V., Danit, L.-V., Siewers, V., Gronover, C. S., Tudzynski, P., Tudzynski, B., and Sharon, A.** (2006). Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: A missing link in ethylene regulation of fungus-plant interactions? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 33-42.
- Dahmus, M. E.** (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 271, 19009-19012.
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Darras, A. I., Joyce, D. C., Terry, L. A., Pompodakis, N. E., and Dimitriadis, C. I.** (2007). Efficacy of postharvest treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate against *Botrytis cinerea* infecting cut *Freesia hybrida* L. flowers. *Australasian Plant Pathology* 36, 332-340.
- de Guido, M. A., Angelini, R. M. D., Pollastro, S., Santomauro, A., and Faretra, F.** (2007). Selection and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to fenhexamid. *Journal of Plant Pathology* 89, 203-210.
- de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N., and Talbot, N. J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389, 244-244.
- de Lorenzo, G., and Ferrari, S.** (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 295-299.
- de Meaux, J., and Mitchell-Olds, T.** (2003). Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. *Heredity* 91, 345 - 352.
- de Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., and Höfte, M.** (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European journal of plant pathology* 104, 279-286.
- de Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I., and Zwiars, L. H.** (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci* 62, 195-207.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Colmenares, A. J., Collado, I. G., and Williamson, B.** (2001). Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57, 689-692.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., and Williamson, B.** (1999). Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant Journal* 20, 485-492.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., and Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* gkn180.
- DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B., and Sweigard, J. A. (1999). *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11, 2013-2030.
- Díaz, J., ten Have, A., and van Kan, J. A. L. (2002). The Role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129, 1341-1351.
- Dickman, M. B., Park, Y. K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., and French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6957-6962.
- Dik, A. J., and Wubben, J. P. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control", pp. 319-333.
- DiMauro, S., and Schon, E. A. (2001). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *American Journal of Medical Genetics* 106, 18-26.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., and Brygoo, Y. (1995). *Boty*, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 103-108.
- Divon, H. H., and Fluhr, R. (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters* 266, 65-74.
- Dobson, M. J., Tuite, M. F., Roberts, N. A., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M., Perkins, R. E., Conroy, S. C., Dunbar, B., and Fothergill, L. A. (1982). Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 10, 2625-2637.
- Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a G α protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* 59, 821-835.
- Donofrio, N. M., and Delaney, T. P. (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to peronospora parasitica in defense compromised *Arabidopsis* nim1-1 and salicylate hydroxylase expressing plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 439-450.
- Doss, R. P., Deisenhofer, J., Krug von Nidda, H.-A., Soeldner, A. H., and McGuire, R. P. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.

- Doss, R. P., Potter, S. W., Chastagner, G. A., and Christian, J. K.** (1993). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1786-1791.
- Doss, R. P., Potter, S. W., Soeldner, A. H., Christian, J. K., and Fukunaga, L. E.** (1995). Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 260-265.
- Droby, S., and Lichter, A.** (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: Etiology, development and management. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control", pp. 349-367.
- Dubos, B.** (1992). Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In "X International Botrytis Symposium: Recent Advances in Botrytis Research". Pudoc, Heraklion, Crete (Greece).
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V., and Sainsard-Chanet, A.** (2000). A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4138-4143.
- Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E., and Pommer, E. H.** (1989). New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *European journal of plant pathology* 95, 53-62.
- Edwards, M. C., Wong, C., and Elledge, S. J.** (1998). Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4291-4300.
- Elad, Y.** (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases *European journal of plant pathology* 102, 719-732.
- Elad, Y.** (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19, 709-714.
- Elad, Y., and Freeman, S.** (2002). Biological control of fungal plant pathogens. In "The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research" (F. Kempken, ed.), Vol. XI, Agricultural Applications., pp. 93-109. Springer, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Elad, Y., and Stewart, A.** (2004b). Microbial control of *Botrytis* spp. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control", pp. 223-241.
- Elad, Y., and Volpin, H.** (1988). Involvement of ethylene and calcium in the *Botrytis* host system. *Phytoparasitica* 16, 193-193.
- Elledge, S. J., and Spottswood, M. R.** (1991). A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. *EMBO Journal* 10, 2653-2659.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Epton, H. A. S., and Richmond, D. V.** (1980). Formation, structure and germination of conidia. In "The Biology of Botrytis " (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds.), pp. 41–83. Academic Press, London.
- Espino, J. J., Brito, N., Noda, J., and González, C.** (2005). *Botrytis cinerea* endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis Physiological and Molecular Plant Pathology 66, 213-221.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T.** (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33, 389-396.
- Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S.** (1988). Sexual-behavior and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology 134, 2543-2550.
- Faretra, F., and Pollastro, S.** (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycological Research 95, 943-951.
- Faretra, F., and Pollastro, S.** (1996). Genetic studies of the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) by analysis of ordered tetrads. Mycological Research 100, 620-624.
- Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., and Kornberg, R. D.** (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIK. Cell 79, 1103-1109.
- Fernández-Ábalos, J. M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B., and Doonan, J. H.** (1998). Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 27, 121-130.
- Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F. M., Cervone, F., and De Lorenzo, G.** (2003). Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. Plant Cell 15, 93-106.
- Finkers, R., van Heusden, A. W., Meijer-Dekens, F., van Kan, J. A. L., Maris, P., and Lindhout, P.** (2007a). The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. Theoretical and Applied Genetics 114, 1071-1080.

- Fitzgerald, A., van Kan, J. A. L., and Plummer, K. M.** (2004). Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology* 41, 963-971.
- Flor, H. H.** (1956). The Complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine* 8, 29-54.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., Hall, J. L., and Williams, L. E.** (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, At β fruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132, 821-829.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., and Brygoo, Y.** (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97, 1251-1267.
- Fu, T. J., Peng, J. M., Lee, G., Price, D. H., and Flores, O.** (1999). Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *Journal of Biological Chemistry* 274, 34527-34530.
- Fulci, V., and Macino, G.** (2007). Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Current Opinion in Microbiology* 10, 199-203.
- Furnari, B. A., Russell, P., and Leatherwood, J.** (1997). pch1 +, a Second Essential C-type Cyclin Gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 12100-12106.
- Garriga, J., and Grana, X.** (2004). Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 337, 15-23.
- Gaté, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D., and Tapiero, H.** (1999). Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomedecine & Pharmacotherapy* 53, 169-180.
- Germeier, C., Hedke, K., and Tiedemann, A. V.** (1994). The use of pH-indicators in diagnostic media for acid-producing plant pathogens. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101, 498-507.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K., and Brygoo, Y.** (1999). Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, transposa and vacuma, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89, 967-973.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., and Brygoo, Y.** (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* 14, 1177-1185.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Gossen, B. D., and Platford, G.** (1999). Blossom blight in alfalfa seed fields in Saskatchewan and Manitoba. *Canadian Plant Disease Survey* 79, 94-95.
- Gossen, B. D., Smith, S. R., and Platford, R. G.** (1994). *Botrytis cinerea* blossom blight of alfalfa on the Canadian prairies. *Plant Disease* 78, 1218.
- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M. H., and Levis, C.** (2004). The tetraspanin Bc-Pls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* 51, 619-629.
- Govrin, E. M., and Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Green, D. R., and Kroemer, G.** (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Greenberg, J. T.** (2003). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 525-545.
- Griffin, D. H.** (1996). Spore development. In "Fungal Physiology" (D. H. Griffin, ed.), pp. 338-342. John Wiley and Sons.
- Griffiths, A. J. F.** (1992). Fungal senescence. *Annual Review of Genetics* 26, 351-372.
- Grindle, M.** (1979). Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*.
- Gronover, C. S., Kasulke, D., Tudzynski, P., and Tudzynski, B.** (2001). The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant-microbe interactions* 14, 1293-1302.
- Gronover, C. S., Schumacher, J., Hantsch, P., and Tudzynski, B.** (2005). A novel seven-helix transmembrane protein BTP1 of *Botrytis cinerea* controls the expression of GST-encoding genes, but is not essential for pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 6, 243-256.
- Groves, J. W., and Loveland, C. A.** (1953). The Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* 45, 415-425.
- Guimarães, R. L., Chetelat, R. T., and Stotz, H. U.** (2004). Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato, and involves induced hyphal death. *European journal of plant pathology* 110, 13-23.
- Güldener, U., Seong, K.-Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J.-R., Adam, G., Mewes, H.-W., Muehlbauer, G. J., and Kistler, H. C.** (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression *in vitro* and *in planta*. *Fungal Genetics and Biology* 43, 316-325.

- Guo, H., and Ecker, J. R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 40-49.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E., and J.R., K.** (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In "Gene structure in eukaryotic microbes" (J. R. Kinghorn, ed.), pp. 93-139. IRL Press, Oxford, UK.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K.** (1998). MAP kinase pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264-1300.
- Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G., and Boccara, M.** (1994). Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, hph. *Current Genetics* 26, 251-255.
- Hamada, W., Soulié, M.-C., Malfatti, P., Bompeix, G., and Boccara, M.** (1997). Stability and modulated expression of a hygromycin resistance gene integrated in *Botrytis cinerea* transformants. *FEMS Microbiology Letters* 154, 187-193.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R.** (1991). "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria," Elsevier, San Diego, CA, EEUU.
- Hansen, H. N., and Smith, R. E.** (1932). An analysis of variation in *Botrytis cinerea* by single spores cultures. *Phytopathology* 22.
- Harper, A. M., Strange, R. N., and Langcake, P.** (1981). Characterization of the nutrients required by *Botrytis cinerea* to infect broad bean leaves. *Physiological Plant Pathology* 19, 153-167.
- Hausbeck, M. K., and Pennypacker, S. P.** (1991). Influence of Grower Activity on Concentrations of Airborne Conidia of *Botrytis cinerea* Among Geranium Cuttings. *Plant Disease* 75, 1236 - 1243.
- Helbig, J.** (2002). Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *BioControl* 47, 85-99.
- Hennebert, G. L.** (1973). Botrytis and Botrytis-like genera. *Persoonia* 7, 183-204.
- Hilber, U. W., Schwinn, F. J., and Schüepp, H.** (1995). Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Journal of Phytopathology* 143, 423-428.
- Hiratsuka, K., Namba, S., Yamashita, S., and Doi, Y.** (1987). Linear plasmid-like DNAs in the fungus *Botrytis cinerea*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 53, 638-642.
- Holstege, F. C. P., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A.** (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B.** (2004). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 9-27. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Howitt, R. L. J., Beaver, R. E., Pearson, M. N., and Foster, R. L. S.** (1995). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. *Mycological research* 99, 1472-1478.
- Hutcheson, S. W.** (1998). Current concepts of active defense in plantas. *Annual Review of Phytopathology* 36, 59-90.
- Jakupovic, M., Heintz, M., Reichmann, P., Mendgen, K., and Hahn, M.** (2006). Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Fungal Genetics and Biology* 43, 8-19.
- Jarvis, W. R.** (1962b). Splash dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Pers. *Nature* 193, 599-599.
- Jarvis, W. R.** (1962c). The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. in a raspberry plantation. *Transactions of the British Mycological Society* 45, 549-559.
- Jarvis, W. R.** (1977). "*Botrytinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. A guide to the literature.," Canada Department of Agriculture (Research Brand), Ottawa (Canada).
- Jarvis, W. R.** (1980). Taxonomy. In "The biology of Botrytis" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds.), pp. 1-18. Academic Press, London, New York.
- Jeon, J., Park, S.-Y., Chi, M.-H., Choi, J., Park, J., Rho, H.-S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Choi, J., Park, J.-Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M.-J., Han, S.-S., Kim, B. R., Khang, C. H., Park, B., Lim, S.-E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H.-S., Kim, H., Kim, S., Park, J., Kang, S., Choi, W.-B., Kang, S., and Lee, Y.-H.** (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics* 39, 561-565.
- Jiang, X., and Wang, X.** (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 73, 87-106.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., and Wood, P. M.** (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1504, 179-195.
- Joubert, D., Slaughter, A., Kemp, G., Becker, J., Krooshof, G., Bergmann, C., Benen, J., Pretorius, I., and Vivier, M.** (2006). The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research* 15, 687-702.

- Juge, N.** (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* 11, 359-367.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S.** (2003). RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 769-776.
- Karagiannis, J., and Balasubramanian, M. K.** (2007). A Cyclin-dependent kinase that promotes cytokinesis through modulating phosphorylation of the Carboxy Terminal Domain of the RNA Pol II Rpb1p Sub-Unit. *PLoS ONE* 2, e433.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E., and van Kan, J. A. L.** (2005a). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant Journal* 43, 213-225.
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L., and van Kan, J. A. L.** (2005b). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Molecular Plant Pathology* 6, 641-652.
- Katan, T., Elad, Y., and Yunis, H.** (1989). Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 38, 86-92.
- Kepcsynski, J., and Kepsynska, E.** (1977). Effect of ethylene on germination of fungal spores causing fruit rot. *Fruit Science reports* 15, 31-35.
- Kerssies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L.** (1997). Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* 81, 781-786.
- Kliebenstein, D. J., Rowe, H. C., and Denby, K. J.** (2005). Secondary metabolites influence Arabidopsis/*Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* 44, 25-36.
- Klimpel, A., Gronover, C. S., Williamson, B., Stewart, J. A., and Tudzynski, B.** (2002). The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 3, 439-450.
- Köhl, J., Molhoek, W. M. L., Van der Plas, C. H., and Fokkeman, N. J.** (1995). Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* 85, 393-401.
- Kong, D., and Richardson, C. C.** (1998). Role of the acidic carboxyl-terminal domain of the single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7 in specific protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6556-6564.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R. G., and Fink, G. R.** (1994). Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO Journal* 13, 6021-6030.
- Kovach, J., Petzoldt, R., and Harman, G. E.** (2000). Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for Botrytis control. *Biological Control* 18, 235-242.
- Krasley, E., Cooper, K. F., Mallory, M. J., Dunbrack, R., and Strich, R.** (2006). Regulation of the oxidative stress response through Slr2p-Dependent destruction of cyclin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 172, 1477-1486.
- Kraus, P. R., and Heitman, J.** (2003). Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 1151-1157.
- Krause, K., and Dieckmann, C. L.** (2004). Analysis of transcription asymmetries along the tRNA(E)-COB operon: evidence for transcription attenuation and rapid RNA degradation between coding sequences. *Nucleic Acids Research* 32, 6276-6283.
- Kuchin, S., Yeghiayan, P., and Carlson, M.** (1995). Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4006-4010.
- Kudlicka, K., and Brown Jr, R. M.** (1997). Cellulose and callose biosynthesis in higher plants (I. Solubilization and Separation of (1->3)- and (1->4)- β -Glucan Synthase Activities from Mung Bean). *Plant Physiology* 115, 643-656.
- Kulakiotu, E. K., Thanassouloupoulos, C. C., and Sfakiotakis, E. M.** (2004). Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on Kiwifruit by volatiles of Isabella grapes. *Phytopathology* 94, 1280-1285.
- Kulkarni, R., Thon, M., Pan, H., and Dean, R.** (2005). Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biology* 6, R24.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M.** (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatic* 5, 150-163.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A., and Boccara, M.** (2006). Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytologist* 170, 537-550.
- Lahue, E. E., Smith, A. V., and Orr-Weaver, T. L.** (1991). A novel cyclin gene from *Drosophila* complements CLN function in yeast. *Genes & Development* 5, 2166-2175.

- Lee, M. G., and Nurse, P.** (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31-35.
- Léopold, P., and O'Farrell, P. H.** (1991). An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins. *Cell* 66, 1207-1216.
- Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L., and Steitz, J. A.** (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283, 220-224.
- Leroux, P.** (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 195-222. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F.** (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58, 876-88.
- Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y.** (1997). Flipper, a mobile *Fot1*-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics* 254, 674-80.
- Lew, D. J., Dulic, V., and Reed, S. I.** (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (*cln*) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206.
- Lewis, D. H.** (1973). Concepts in Fungal nutrition and origin of biotrophy. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 48, 261-278.
- Liao, S.-M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J. J., and Young, R. A.** (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374, 193-196.
- Lindquist, S., and Kim, G.** (1996). Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5301-5306.
- Linskenn, H. F., and Haage, P.** (1963). Cutinase-Nachweis in phytopathogene pilzen. *Phytopathology* 48, 306-311.
- Liu, X. D., and Thiele, D. J.** (1996). Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes & Development* 10, 592-603.
- Lorbeer, J. W.** (1980). Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In "The Biology of *Botrytis*" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds.), pp. 19-40. Academic Press, London, UK.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Lorenz, G., and Pommer, E. H.** (1985). Morphological and physiological characteristics of dicarboximide-sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. EPPO Bulletin 15, 353-360.
- Lyon, G. D., Goodman, B. A., and Williamson, B.** (2004). *Botrytis cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, ed.), pp. 119-141. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., and Fröhlich, K.-U.** (2002). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. Current Genetics 41, 208-216.
- Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., and Reinberg, D.** (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. Nature 381, 86-89.
- Malumbres, M., and Barbacid, M.** (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends in Biochemical Sciences 30, 630-641.
- Mansfield, J. W., and Richardson, A. I.** (1981). The ultrastructure of interactions between Botrytis species and broad bean leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology 19, 41-48.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L.** (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Ecology 43, 359-366.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., and Bryant, S. H.** (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic Acids Research 37, D205-210.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D., and Bryant, S. H.** (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. Nucleic Acids Research 35, D237-240.
- Marchler-Bauer, A., and Bryant, S. H.** (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. Nucleic Acids Research 32, W327-331.

- Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. H.** (1996). Control of RNA Polymerase II Elongation potential by a novel Carboxyl-Terminal Domain kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27176-27183.
- Marshall, R. M., and Grana, X.** (2006). Mechanisms controlling CDK9 activity. *Frontiers in Bioscience* 11, 2598-2613.
- Maude, R. B.** (1980). Disease control. In "The Biology of Botrytis" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds.), pp. 275–308. Academic Press, London.
- McKeen, W. E.** (1974). Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64, 461-467.
- McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., and Chalutz, E.** (1990). Effect of inoculum concentrations and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology* 80, 456-461.
- McNicol, R. J., Williamson, B., and Young, K.** (1989). Ethylene production by black currant flowers infected by *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae* 262, 209-215.
- Mendgen, K., and Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7, 352-356.
- Mercier, J., and Wilson, C. L.** (1994). Colonization of Apple Wounds by Naturally Occurring Microflora and Introduced *Candida oleophila* and Their Effect on Infection by *Botrytis cinerea* during Storage *Biological Control* 4, 138-144.
- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L. H.** (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO Journal* 11, 2909-2917.
- Michielse, C. B., J Hooykaas, P. J., J J van den Hondel, C. A. M., and J Ram, A. F.** (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols* 3, 1671-1678.
- Mignotte, B. and Vayssiere, J.L.** (1998). Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry* 252, 1-15.
- Molz, L. and Beach, D.** (1992). Characterization of the fission yeast mcs2 cyclin and its associated protein kinase activity. *EMBO Journal* 12, 1723-1732.
- Moller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., and Geiger, H. H.** (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20, 6115-6116.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Monschau, N., Stahmann, K. P., Pielken, P., and Sahm, H.** (1997). In vitro synthesis of β -(1-3)-glucan with a membrane fraction of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 101, 97-101.
- Moore, A. L., and Siedow, J. N.** (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1059, 121-140.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., and Mager, W.** (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* 19, 651-658.
- Mori, T., Anazawa, Y., Matsui, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., and Arakawa, H.** (2002). Cyclin K as a direct transcriptional target of the p53 tumor suppressor. *Neoplasia* 4, 268-274.
- Movahedi, S., and Heale, J. B.** (1990). The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36, 303-324.
- Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R., and Melgarejo, P.** (2003b). Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *European Journal of Plant Pathology* 109, 515-522.
- Moyano, C., Raposo, R., Gómez, V., and Melgarejo, P.** (2003a). Integrated *Botrytis cinerea* management in Southeastern Spanish Greenhouses. *Journal of Phytopathology* 151, 80-85.
- Muckenschnabel, I., Williamson, B., Goodman, B. A., Lyon, G. D., Stewart, D., and Deighton, N.** (2001b). Markers for oxidative stress associated with soft rots in French beans (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Botrytis cinerea*. *Planta* 212, 376-381.
- Murray, A. W.** (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Ninomiya-Tsuji, J., Nomoto, S., Yasuda, H., Reed, S. I., and Matsumoto, K.** (1991). Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast cdc28 mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9006-9010.
- Nonet, M., Sweetser, D., and Young, R. A.** (1987). Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* 50, 909-915.
- Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C., Horikoshi, M., and Roeder, R.** (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α . *Mol. Cell. Biol.* 15, 4856-4866.

- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D.** (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Development* 10, 2657-2683.
- Osiewacz, H. D.** (2002). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Research Reviews* 1, 425-442.
- Palmucci, H. E., Rivera, M. C., and Wright, E. R.** (1997). *Botrytis cinerea* Pers. en plantas ornamentales cultivadas en Argentina. *Boletín de sanidad Vegetal. Plagas* 23, 295-299.
- Pande, S., Singh, G., Narayana Rao, J., Bakr, M. A., Chaurasia, P. C. P., Joshi, S., Johansen, C., Singh, S. D., Kumar, J., Gowda, C. L. L., and Rahman, M. M.** (2002). "Integrated management of botrytis gray mold of chickpea." International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, Andhra Pradesh (India).
- Patel, R. M., van Kan, J. A. L., Bailey, A. M., and Foster, G. D.** (2008). RNA-mediated gene silencing of superoxide dismutase (*bcsod1*) in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 98, 1334-9.
- Peng, G., Sutton, J. C., and Kevan, P. G.** (1992). Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocadium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 117-129.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., and Price, D. H.** (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes & Development* 12, 755-762.
- Perfect, S. E., and Green, J. R.** (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* 2, 101-108.
- Petit, J., Boisseau, P., and Arveiler, B.** (1994). Glucanex: a cost-effective yeast lytic enzyme. *Trends in Genetics* 10, 4-5.
- Pillonel, C., and Meyer, T.** (1997). Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science* 49, 229-236.
- Pines, J.** (1993). Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends in Biochemical Sciences* 18, 195-197.
- Polcic, P. and Forte, M.** (2003). Response of yeast to the regulated expression of proteins in the Bcl-2 family. *Biochemical Journal* 374, 393-402.
- Powelson, R. L.** (1960). Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 50, 491-494.
- Powell, A. L. T., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B., and Labavitch, J. M.** (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 942-950.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Prins, T. W., Wagemakers, L., Schouten, A., and van Kan, J. A. L.** (2000). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 1, 169-178.
- Pritchard, P. M., Hausbeck, M. K., and Heins, R. D.** (1996). The influence of diurnal temperatures on the postharvest susceptibility of poinsettia to *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 80, 1011-1014.
- Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G.** (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.
- Prusky, D., and Keen, N. T.** (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease* 77, 114 - 119.
- Quidde, T., Büttner, P., and Tudzynski, P.** (1999). Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene Coding for a putative avenacinase. *European journal of plant pathology* 105, 273-283.
- Raha, S., and Robinson, H.** (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS* 25, 502-508.
- Rambosek, J., Leach, J., and Kinsey, J. A.** (1987). Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* 6, 357-393.
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V., and Melgarejo, P.** (1996). Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45, 497-505.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T., and Melgarejo, P.** (2000). Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology* 90, 1246-1249.
- Reed, J. C.** (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.
- Reino, J. L., Hernández-Galán, R., Durán-Patrón, R., and Collado, I. G.** (2004). Virulence toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 152, 563-566.
- Reuveni, R., and Raviv, M.** (1992). The effect of spectrally-modified polyethylene films on the development of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown tomato plants. *Biological Agriculture and Horticulture* 9, 77-86.
- Reuveni, R., Raviv, M., and Bar, R.** (1989). Sporulation of *Botrytis cinerea* as affected by photo-selective polyethylene sheets and filters. *Annals of Applied Biology* 115, 417-424.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., and Lees, E.** (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* 12, 2631-2640.

- Riffle, J. W., and Smith, R. S.** (1979). Nursery diseases of Western conifers (U. S. D. o. A. F. Service, ed.), Vol. 157.
- Rijkenberg, F. H. J., Deleeuw, G. T. N., and Verhoeff, K.** (1980). Light and electron microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique 58, 1394-1404.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K. M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B., and Tudzynski, P.** (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. Molecular Plant Pathology 5, 17-27.
- Rolland, S., Jobic, C., Fèvre, M., and Bruel, C.** (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. Current Genetics 44, 164-171.
- Rosewich, U. L., and Kistler, H. C.** (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. Annual review of phytopathology 38, 325-363.
- Rosslenbroich, H.-J., and Stuebler, D.** (2000). *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection 19, 557-561.
- Rowe, H. C., and Kliebenstein, D. J.** (2007). Elevated genetic variation within virulence-associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci. Molecular Plant-Microbe Interactions 20, 1126-37.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.-P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H. J., and Egly, J.-M.** (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. Cell 79, 1093-1101.
- Salama, S. R., Hendricks, K. B., and Thorner, J.** (1994). G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. Molecular and Cellular Biology 14, 7953-7966.
- Salinas, J., and Verhoeff, K.** (1995). Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. European journal of plant pathology 101, 377-386.
- Salinas, J. C.** (1992). Funtion of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*, University of Utrech, Utrech, The Netherlands.
- Samali, A., and Cotter, T. G.** (1996). Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. Experimental Cell Research 223, 163-170.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual," 2nd Edition/Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santoro, N., and Thiele, D. J.** (1997). Yeast stress responses. In "Molecular Biology Intelligence Unit" (S. Hohmann and W. H. Mager, eds.), pp. 171-203. R. G. Landes Co., Austin, Texas.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siegrave;cle. *Science* 283, 1488-1493.
- Scheffler, I. E.** (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3-31.
- Schouten, A., Tenberge, K. B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B., and van Kan, J. A. L.** (2002). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 3, 227-238.
- Schumacher, J., de Larrinoa, I. F., and Tudzynski, B.** (2008a). Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryotic Cell* 7, 584-601.
- Schumacher, J., Kokkelink, L., Huesmann, C., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Barakat, R., Tudzynski, P., and Tudzynski, B.** (2008b). The cAMP-Dependent signaling pathway and its role in conidial germination, growth, and virulence of the gray mold *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1443-1459.
- Segmuller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., and Tudzynski, P.** (2007). BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell* 6, 211-221.
- Seong, K., Hou, Z., Tracy, M., Kistler, H. C., and Xu, J.-R.** (2005). Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 95, 744-750.
- Sherald, J. L., and Sisler, H. D.** (1970). Antimycin A-resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. *Plant Physiology* 46, 180-182.
- Shilatifard, A.** (1998). Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB Journal* 12, 1437-1446.
- Shim, W.-B., and Woloshuk, C. P.** (2001). Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin like (C-Type) gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1607-1612.

- Shishiyama, J., Araki, F., and Akai, S.** (1970). Studies on cutin-esterase II. Characteristics of cutin-esterase from *Botrytis cinerea* and its activity on tomato-cutin. *Plant Cell Physiology* 11, 937-945.
- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J.** (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* 6, 1653-1663.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Gronover, C. S., Pradier, J.-M., Tudzynsk, B., and Tudzynski, P.** (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that Botrydial is a strain-specific virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 602-612.
- Skulachev, V. P.** (2002). Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Letters* 528, 23-26.
- Smet, K. D., Eberhardt, I., Reekmans, R., and Contreras, R.** (2004). Bax-induced cell death in *Candida albicans*. *Yeast* 21, 1325-1334.
- Smith, C. L., Peterson, C. L., and Gerald, P. S.** (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. In "Current Topics in Developmental Biology", Vol. 65, pp. 115-148. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.
- Smith, R. E.** (1900). *Botrytis* and *Sclerotinia*: Their relation to certain plant diseases and to each other. *Botanical Gazette* 29, 369-407.
- Solomon, P. S., Tan, K. C., and Oliver, R. P.** (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology* 4, 203-210.
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C., Simmonds, J., Cooper, R. M., and Oliver, R. P.** (2005). The Mak2 MAP kinase signal transduction pathway is required for pathogenicity in *Stagonospora nodorum*. *Current Genetics* 48, 60-68.
- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J. A. L., and Bakker, F. T.** (2007a). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology* 44, 52-63.
- Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. L.** (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol Biol Evol* 22, 333-346.
- Stahmann, K. P., Pielken, P., Schimz, K. L., and Sahn, H.** (1992). Degradation of extracellular β -(1,3)(1,6)-D-Glucan by *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3347-3354.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., and Davis, R. W.** (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* 31, 400-404.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Surosky, R. T., Strich, R., and Esposito, R. E.** (1994). The yeast UME5 gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3446-3458.
- Sutton, J. C., Li, D.-W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., and Valdebenito-Sanhueza, R. M.** (1997). *Gliocadium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-328.
- Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Leopold, P., Schultz, S. J., and Nigg, E. A.** (1995). Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8871-8875.
- ten Have, A., Breuil, W. O., Wubben, J. P., Visser, J., and van Kan, J. A. L.** (2001). *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. *Fungal Genetics and Biology* 33, 97-105.
- ten Have, A., Dekkers, E., Kay, J., Philip, L. H., and van Kan, J. A. L.** (2004). An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology* 150, 2475-2489.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., and van Kan, J. A. L.** (1998). The Endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1009-1016.
- Tenberge, K. B.** (2004). Morphology and cellular organisation in *Botrytis* interactions with plants. In "*Botrytis: Biology, Pathology and Control*" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 67-84. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Tenberge, K. B., Beckedorf, M., Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M., and von den Driesch, M.** (2002). *In situ* localization of AOS in host-pathogen interactions. *Microscopy and Microanalysis* 8, 250-251.
- Thevelein, J. M.** (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 48, 42-59.
- Thines, E., Weber, R. W. S., and Talbot, N. J.** (2000). MAP Kinase and protein kinase A dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 12, 1703-1718.
- Thomma, B. P. H. J., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W. F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* 19, 163-171.

- Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Cammue, B. P. A., and Broekaert, W. F.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13, 63-68.
- Tsujimoto, Y.** (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of Cellular Physiology* 195, 158-167.
- Tudzynski, B.** (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 597-611.
- Tudzynski, B., and Schulze Gronover, C.** (2004). Signalling in *Botrytis cinerea*. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 85-97. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Tudzynski, P., and Kokkelink, L.** (2009). *Botrytis cinerea*: Molecular aspects of a necrotrophic life style. In "The Mycota", pp. 29-50.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., and Futcher, B.** (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *eMBO Journal* 11, 1773-1784.
- Typas, M. A., Mavridou, A., and Kouvelis, V. N.** (1998). Mitochondrial DNA differences provide maximum intraspecific polymorphism in the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*, and allow isolate detection/ identification. In "Molecular variability of fungal pathogens" (P. Bridge, Y. Cousteaudier and J. Clarkson, eds.), pp. 227-238. CAB International, Wallingford, UK.
- Uptain, S. M., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J.** (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 66, 117-172.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A. s., Reignault, P., Levis, C., and Boccara, M.** (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 360-367.
- Vallejo, I., Santos, M., Cantoral, J. M., Collado, I. G., and Rebordinos, L.** (1996). Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* Strains. *Hereditas* 124, 31-38.
- van Baarlen, P., Legendre, L., and van Kan, J. A. L.** (2004). Plant defence compounds against *Botrytis* infection. In "Botrytis: Biology, Pathology and Control" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 143-161. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., and van Kan, J. A. L.** (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* 8, 41-54.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- van den Heuvel, J.** (1981). Effect of inoculum composition on infection of french bean leaves by conidia of *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 87, 55-64.
- van den Heuvel, J., and Waterreus, L. P.** (1983). Conidial Concentration as an important factor determining the type of pre-penetration structures formed by *Botrytis cinerea* on leaves of French Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Pathology* 32, 263-272.
- van der VlugtBergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Vantklooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L.** (1993). Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 97, 1193-1200.
- van der VlugtBergmans, C. J. B., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L.** (1997b). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 21-29.
- van Kan, J. A. L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci* 11, 247-53.
- van Kan, J. A. L., vant Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T., and van der VlugtBergmans, C. J. B.** (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 30-38.
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.-M., and Levis, C.** (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology* 50, 1451-1465.
- Viaud, M., Legeai, F., Pradier, J.-M., Brygoo, Y., Bitton, F., Weissenbach, J., Brunet-Simon, A., Duclert, A., Fillinger, S., Fortini, D., Gioti, A., Giraud, C., Halary, S., Lebrun, I., Pêcheur, P., Samson, D., and Levis, C.** (2005). Expressed sequence tags from the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *European journal of plant pathology* 111, 139-146.
- Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., and Hilber, U. W.** (2002). Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 106, 329-335.
- Voegelé, R. T.** (2006). *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiology Letters* 259, 165-173.
- Voegelé, R. T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I., and Mendgen, K.** (2005). Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the niotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol.* 137, 190-198.

- von Tiedemann, A.** (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50, 151-166.
- Wallace, D. C.** (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- Ward, M.** (1991). *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. In "Modern microbial genetics" (U. N. Streips and R. E. Yasbin, eds.), Vol. XIV, pp. 455-496. Wiley-Liss, New York, N.Y.
- Weeds, P. L., Beever, R. E., Sharrock, K. R., and Long, P. G.** (1999). A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54, 13-35.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A., and Beer, S. V.** (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257, 85-88.
- Weiss-Berg, E., and Tamm, C.** (1971). The influence of deoxycorticosterone, digitoxigenin and cyanide ions on the respiration of *Fusarium lini* (Bolley). *Cellular and Molecular Life Sciences* 27, 778-779.
- West, J. S., Pearson, S., Hadley, P., Wheldon, A. E., Davis, F. J., Gilbert, A., and Henbest, R. G. C.** (2000). Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology* 136, 115-120.
- Wiesenberger, G., and Fox, T.** (1997). Pet127p, a membrane-associated protein involved in stability and processing of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2816-2824.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y., and Zimand, G.** (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99, 1303-1310.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and van Kan, J. A. L.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561-580.
- Wind, M., and Reines, D.** (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays* 22, 327-336.
- Wisniewski, M. E., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., and Chalutz, E.** (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 245-258.

Análisis y caracterización de genes de *B. cinerea* inducidos *in planta*

David Benito Pescador

- Wolpert, T. J., Duncan, G. H., and Ciuffeti, L. M.** (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a Name?*. Annual Review of Phytopathology 40, 251 - 285.
- Woodford, D. V., Parish, H. H., and Moradas-Ferreira, P.** (1995). Hydrogen peroxide induces DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 11, 149.
- Wubben, J. P., ten Have, A., van Kan, J. A. L., and Visser, J.** (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. Current Genetics 37, 152-157.
- Xiao, C. L., Chandler, C. K., Price, J. F., Duval, J. R., Mertely, J. C., and Legard, D. E.** (2001). Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and Powdery Mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. Plant Disease 85, 901-909.
- Xu, J. R.** (2000). MAP kinases in fungal pathogens. Fungal Genetics and Biology 31, 137-152.
- Xu, W. T., Huang, K. L., Guo, F., Qu, W., Yang, J. J., Liang, Z. H., and Luo, Y. B.** (2007). Post-harvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology 46, 86-94.
- Yang, Q., Xuan Trinh, H., Imai, S., Ishihara, A., Zhang, L., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S.** (2004). Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in Oat. Molecular Plant-Microbe Interactions 17, 81-89.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.
- Yukioka, H., Inagaki, S., Tanaka, R., Katoh, K., Miki, N., Mizutani, A., and Masuko, M.** (1998). Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1442, 161-169.
- Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P. X., and Kroemer, G.** (1997). Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: Apoptosis and Necrosis. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 29, 185-193.
- Zehring, W. A., Lee, J. M., Weeks, J. R., Jokerst, R. S., and Greenleaf, A. L.** (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential *in vivo* but is not required for accurate transcription initiation *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85, 3698-3702.

- Zeviani, M., Spinazzola, A., and Carelli, V.** (2003). Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Current Opinion in Genetics & Development* 13, 262-270.
- Zhou, X., Heyer, C., Choi, Y.-E., Mehrabi, R., and Xu, J.-R.** (2009). The CID1 cyclin C-like gene is important for plant infection in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 143-151.

Botrytis




cialle
CENTRO HISPANOLUSO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA