



**Silenciamiento de múltiples genes en
Botrytis cinerea mediante PTGS. Aplicación
al estudio del papel en la virulencia de las
xilanasas secretadas por el hongo**

**Silencing of multiple genes in *Botrytis
cinerea* by PTGS. Application to the study
of the role in virulence of xylanases secreted
by the fungus**

Trabajo de Fin de Grado

Néstor García Expósito

Grado en Biología, Julio 2014

**SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN
TRABAJO FIN DE GRADO
Curso Académico: 20__/20__**

ENTRADA

Fecha:
Núm:

Datos Personales

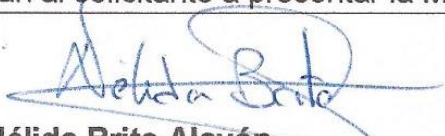
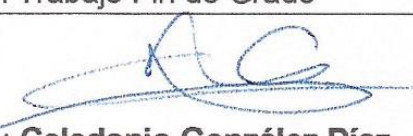
Nº DNI o pasaporte: 43831827Z	Nombre y Apellidos: Néstor García Expósito
Teléfono: 646-770-137	Dirección de correo electrónico: alu0100538007@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Silenciamiento de múltiples genes en *Botrytis cinerea* mediante PTGS. Aplicación al estudio del papel en la virulencia de las xilanasas secretadas por el hongo.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

Dña. Nélide Brito Alayón	
Profesora del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
y D. Celedonio González Díaz	
Profesor del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: Nélide Brito Alayón	 Fdo.: Celedonio González Díaz

La Laguna, a 8 de julio de 2014

Firma del interesado/a


SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación favorable de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para el interesado/a

Este Trabajo Fin de Grado ha sido tutorizado por
Nélida Brito Alayón y Celedonio González Díaz, y
codirigido por **Mario González Carracedo**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Botrytis cinerea</i> Y SU CICLO DE VIDA	1
2. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <i>B. cinerea</i>	2
3. SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RNA	3
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	6
2. MEDIOS DE CULTIVO	6
3. PLÁSMIDOS	7
4. AISLAMIENTO DE CONIDIAS DE <i>B. cinerea</i>	8
5. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i>	8
6. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	9
7. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	9
8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA	10
9. TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	10
10. PCR DE COLONIAS.....	11
11. TRANSFORMACIÓN DE <i>B. cinerea</i>	11
12. ENSAYO DE VIRULENCIA DE <i>B. cinerea</i>	12
13. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>B. cinerea</i>	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENÓMA DE <i>B. cinerea</i>	14
1.1. Identificación de los genes que codifican para endo- β -1,4 xilanasas en el genoma de <i>B. cinerea</i>	14
1.2. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas pertenecientes a las familias GH10 y GH11	16
1.3. Diseño de un gen quimérico para inducir el silenciamiento de las 5 xilanasas de <i>B. cinerea</i>	16
2. OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS TRANSFORMANTES CONTENIENDO Hom_XyL.....	18
3. TRANSFORMACIÓN DE <i>B. cinerea</i>	22
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES	22
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno capaz de infectar más de 200 especies vegetales causando importantes pérdidas en la agricultura. Entre las proteínas que secreta se encuentran varias endo- β -1,4-xilanasas, las cuales participan en la degradación de un importante componente de la pared celular vegetal, el xilano. Los mutantes carentes de alguna de las xilanasas que se han generado previamente muestran una pérdida muy pequeña, o ninguna, de la capacidad de infección, posiblemente porque el hongo secreta varias proteínas con esta actividad capaces de compensar la falta de la enzima ausente en el mutante.

En este trabajo, se ha analizado el genoma de *B. cinerea* para determinar el número de endo- β -1,4-xilanasas que codifica y se ha diseñado un estrategia para silenciar de forma simultánea, mediante RNA de interferencia, los cinco genes encontrados. Para ello, se sintetizó químicamente un gen quimérico compuesto de secuencias cortas obtenidas de estos cinco genes, y se expresó en el hongo de manera que se obtuviese RNA de doble cadena con la secuencia correspondiente. Con el fin de lograr este objetivo se ensayaron dos técnicas alternativas: 1) la expresión simultánea de la cadena sentido y de la antisentido, y 2) la expresión de dos secuencias en tándem, invertidas, cuya transcripción da lugar a un RNA de doble cadena con estructura de tallo-bucle. Ambos sistemas se han puesto en práctica, se han obtenido los transformantes de *B. cinerea* y se ha realizado un análisis preliminar de los mismos.

ABSTRACT

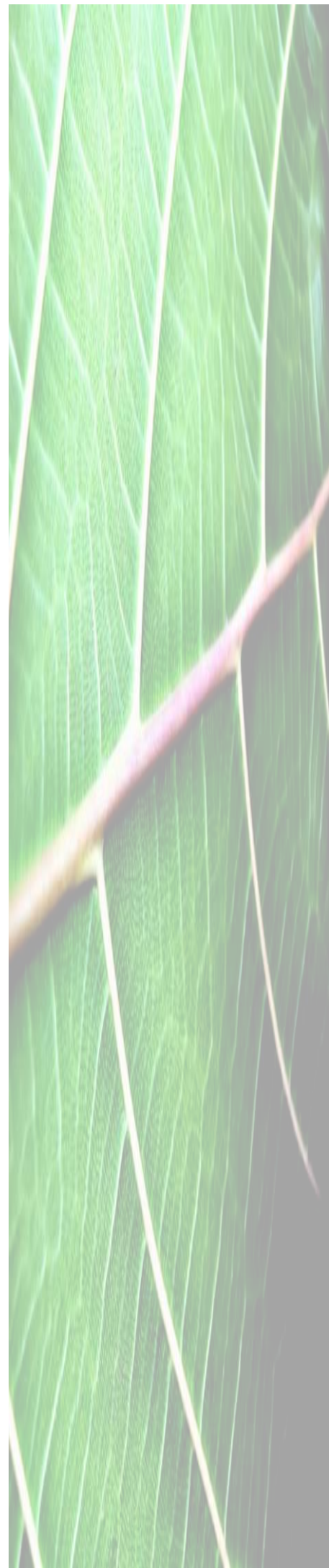
Botrytis cinerea is a phytopathogenic fungus able of infecting more than 200 plant species causing major losses in agriculture. Among the proteins secreted by this fungus, several endo- β -1,4-xylanases can be found, which are involved in the degradation of an important component of plant cell wall, xylan. The mutants lacking one of these xylanases that have generated previously show little, or any, reduction of virulence, possibly because the fungus secretes other proteins with this activity that can compensate for the one missing in the mutant.

In this work the genome of *B. cinerea* has been analyzed to determine the number of endo- β -1,4-xylanases that it encodes, and a strategy has been designed to simultaneously silence by RNA interference the five genes that were encountered. In order to do this, a chimeric gene was chemically synthesized, composed of short sequences obtained from these five genes, and was expressed in the fungus in such a way that double stranded RNA with the corresponding sequence is obtained. To achieve this, two alternative methods were tested: 1) the simultaneous expression of the sense and antisense strands, and 2) the expression of two inverted tandem sequences whose transcription results in a double stranded RNA with stem-loop structure. Both systems were tested, the *B. cinerea* transformants were obtained, and a preliminary analysis of them has been performed.

Palabras claves/keywords:

Botrytis cinerea, xilanasas/xylanase, silenciamiento/silencing, RNAi, “building block”

INTRODUCCIÓN



1. *Botrytis cinerea* Y SU CICLO DE VIDA

Botrytis cinerea Pers.:Fr (*B.cinerea*) es un hongo fitopatógeno capaz de infectar alrededor de 200 especies vegetales, provocando la enfermedad conocida como “podredumbre gris” (Jarvis, 1977). En Canarias, *B. cinerea* tiene una gran incidencia, afectando a los cultivos mayoritarios como son la vid y el tomate, con gran importancia económica en las islas.

Según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, *Botrytis cinerea* pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* y familia *Sclerotiniaceae* (Williamson et al., 2007). Se trata de un hongo pleomórfico que recibe el nombre de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz en su estado sexual y de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, en su estado asexual. En su estado sexual utiliza ascosporas como medio de propagación, mientras que las conidias, esporas asexuales especializadas, no móviles, son las unidades reproductivas en el estado asexual.

El ciclo de vida comienza con la formación de las conidias en los conidióforos y su posterior liberación y propagación por corrientes de aire a grandes distancias. Cuando, las conidias llegan a la superficie de la planta se adhieren débilmente y, si las condiciones son favorables (alta humedad relativa, presencia de nutrientes), se produce su germinación. El tubo germinal se prolonga e inicia la penetración del tejido vegetal, dando lugar a una lesión primaria (van Kan, 2006). En todo este proceso, el hongo secreta diversos componentes para debilitar las defensas del hospedador, destacando enzimas hidrolíticas que degradan las envueltas celulares como celulasas, xilanasas, poligalacturonasas, etc. (Schumacher and Tudzynski, 2012). La lesión en el hospedador se generaliza cuando los tejidos sanos circundantes son colonizados y macerados, produciéndose una necrosis generalizada y la muerte de la planta. Se inicia, entonces, la producción de nuevas conidias que serán diseminadas por el aire, pudiendo colonizar nuevos hospedadores, completándose así, el ciclo de vida del hongo (Schumacher and Tudzynski, 2012).

Para el control de *B. cinerea* se han ensayado diversas estrategias, siendo el uso de fungicidas la más popular de todas ellas. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a estos fármacos (Leroux, 2004), la contaminación ambiental que provocan (Torres del Castillo, 2001) y su coste económico (Rosslenbroich and Stuebler, 2000), hacen que se potencie la búsqueda de nuevas alternativas de control más efectivas y menos dañinas para el medio ambiente.

En este contexto, la identificación de factores de virulencia o factores de patogenicidad de *B. cinerea* presenta un gran interés, porque puede conducir al desarrollo de nuevas formas de lucha contra la infección, estableciendo mecanismos que permitan neutralizar este tipo de factores en el hongo.

2. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *B. cinerea*

En el análisis de la interacción hongo-planta y la búsqueda e identificación factores de patogenicidad, se ha prestado especial atención a la degradación de la pared celular vegetal por el huésped, por ser ésta una de las primeras barreras a superar en el proceso infectivo. Celulasas, hemicelulasas y endopoligalacturonasas son las principales enzimas secretadas durante la colonización del tejido, responsables de la degradación de los componentes mayoritarios de la pared, la celulosa, las hemicelulosas y la pectina, respectivamente. Analizar el papel que cada una de estas enzimas tiene en la virulencia del huésped, no es tarea fácil en *B. cinerea*, ya que se ha detectado una gran redundancia entre las proteínas que secreta al medio extracelular. Así, se han descrito 6 endopoligalacturonasas (Wubben et al., 2000; van Kan, 2006), 2 pectin-metil esterases, (Valette-Collet et al., 2003; Kars et al., 2005) o 14 aspartil proteasas entre las proteínas que componen el secretoma del hongo (Espino et al., 2010). Las estrategias experimentales comúnmente utilizadas para analizar el papel de cualquiera de ellas, la interrupción génica (Valette-Collet et al., 2003; Prins et al., 2000; Soulie et al., 2003) y el remplazamiento génico (Melendez et al., 2009; Rui and Hahn, 2007; Brito et al., 2006), dejan de ser útiles, cuando el hongo secreta más de una enzima al medio extracelular con similar actividad a la proteína que se ha delecionado. Además, el número de marcadores selectivos de resistencia a antibióticos disponibles para poder realizar simultáneamente mutaciones de varios genes en este hongo, es muy limitado. Se requieren, por tanto, nuevas estrategias que permitan analizar el papel de un grupo de proteínas con propiedades similares en el proceso infectivo desarrollado por el hongo.

Entre las enzimas hidrolíticas que degradan la pared vegetal secretadas por *B. cinerea*, se ha podido comprobar que la endo- β -1,4-glucanasa Cel5A (Espino et al., 2005), a pesar de que se expresa durante la infección, no es esencial para la virulencia, mientras que la endopoligalacturonasa 1 se ha definido como factor de patogenicidad, cuya mutación provoca una disminución importante de las lesiones producidas por el hongo (ten Have et al., 1998). El análisis de las xilanasas secretadas por *B. cinerea* ha revelado que la endo- β -1,4-xilanasas Xyn11A, una glicosil hidrolasa de la familia 11, es necesaria para el establecimiento de la

infección (Brito et al., 2006), aunque su delección provocó tan sólo una disminución aproximada del 30% en la actividad xilanasa detectada en el medio extracelular (Brito et al., 2006). Estudios posteriores mostraron, que esta enzima, en realidad, actúa como un elicitador, provocando independientemente de su actividad, la respuesta hipersensible en la planta (Noda et al., 2010).

El hecho de que la mutación del gen *xyn11A* sólo provocase la pérdida de la tercera parte de la actividad xilanasa total en el medio extracelular, pone de manifiesto la existencia de otras proteínas con la misma actividad. Hasta el momento, por tanto, no se ha podido estudiar si la presencia en el secretoma de proteínas con capacidad hidrolítica sobre el xilano afecta de manera relevante a la virulencia del hongo.

El principal objetivo de este trabajo es analizar la presencia de otras endo- β -1,4- xilanasas en el medio extracelular, ya que estas enzimas son las primeras en actuar en la degradación del xilano, y utilizando el silenciamiento génico como nueva aproximación experimental en biología molecular, estudiar su posible papel en la virulencia de *B. cinerea*.

3. SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RNA

El silenciamiento génico por RNA o interferencia por RNA (RNAi) fue descrito en hongos filamentosos por primera vez en *Neurospora crassa* (Romano and Macino, 1992) y, desde entonces, han sido numerosas las especies de hongos en las que también ha sido estudiado este fenómeno (Chang et al., 2012a) (Nunes and Dean, 2012).

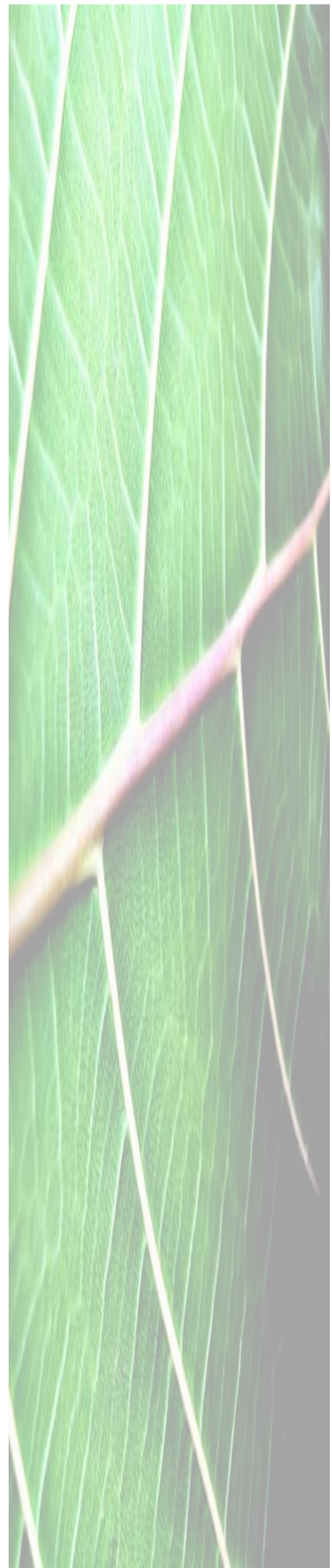
El RNAi es desencadenado por moléculas de RNA de doble cadena (RNAdc) de pequeño tamaño que presentan homología de secuencia con el DNA o RNA diana y que provocan la metilación del DNA y modificación de la cromatina (silenciamiento génico transcripcional, TGS) o la degradación del mRNA y represión de su traducción (silenciamiento génico post-transcripcional, PTGS) (Burroughs et al., 2014a). En el proceso intervienen proteínas muy conservadas, como las Dicer, Argonautas y RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRP) (Chang et al., 2012b). Básicamente, el silenciamiento génico post-transcripcional se inicia por la presencia de una molécula de ARNdc larga, exógena o inducida por la presencia de transposones o transgenes repetidos, que es reconocida por Dicer, una ribonucleasa de la clase III de la superfamilia RNasa-III. Esta ribonucleasa provoca la degradación de la molécula de ARNdc en pequeños fragmentos de 21 a 24 nucleótidos, los siRNAs, que a su vez son acoplados al RISC o RNA-induced silencing complex, que será el responsable de la búsqueda

de los ARNm diana, con regiones complementarias a los siRNAs. La proteína Argonauta central de este complejo catalizará entonces la degradación del mRNA, provocando el silenciamiento post-transcripcional del gen correspondiente (Chang et al., 2012a; Wilson and Doudna, 2013).

El silenciamiento génico por RNA se considera un mecanismo fundamental en la regulación de la expresión génica y en la defensa contra virus y transposones (Burroughs et al., 2014b), y contra patógenos no virales regulando la respuesta inmune (Pumplin and Voinnet, 2013). Sin embargo, también se ha convertido en una importante herramienta para analizar la función de los genes, permitiendo manipular la expresión de éstos y analizar su función, en diversos hongos filamentosos, además de en otros organismos (Kuck and Hoff, 2010). Para ello, se han desarrollado, básicamente dos estrategias, que conducen ambas a la generación de moléculas de ARNdc que sirvan de inductores de todo el proceso del silenciamiento (Shan, 2010). La primera de ellas consiste en transformar al organismo con construcciones con el gen o un fragmento del mismo en orientaciones contrarias (sentido y antisentido) que provoquen la aparición de dos cadenas de ARNm complementarias entre sí, que hibridarán en el citoplasma dando lugar a una molécula de ARN bicatenario. La segunda, la estrategia tallo:bucle o *hairpin*, utiliza una construcción que exprese dos regiones invertidas en tándem del gen a silenciar, separadas por un fragmento de ADN inespecífico no relacionado, de forma que los transformantes producen un ARN con estructura de horquilla, con una región de doble cadena debido a la complementariedad de las regiones invertidas y un lazo debido al fragmento que separa estas regiones (Nguyen et al., 2008).

En el presente trabajo se pretende utilizar estas dos estrategias para conseguir silenciar simultáneamente todas las endo- β -1,4 xilanasas sintetizadas por *B. cinerea* por el método de silenciamiento de múltiples genes conocido como *building block*. Este nuevo sistema ya ha sido ensayado con éxito en *Magnaporthe oryzae* (Van et al., 2012; Nguyen et al., 2011) y consiste en la generación de una secuencia artificial compuesta de regiones cortas de los genes que se desea silenciar, que una vez introducida en el hongo por cualquiera de las dos estrategias descritas anteriormente (sentido-antisentido y tallo-bucle), dará lugar al silenciamiento de todos ellos. De esta forma, se espera disponer de cepas de *B. cinerea* silenciadas para todas las xilanasas que su genoma codifica y se podrá analizar si la carencia de esta actividad enzimática en su secretoma afecta drásticamente la capacidad infectiva del hongo.

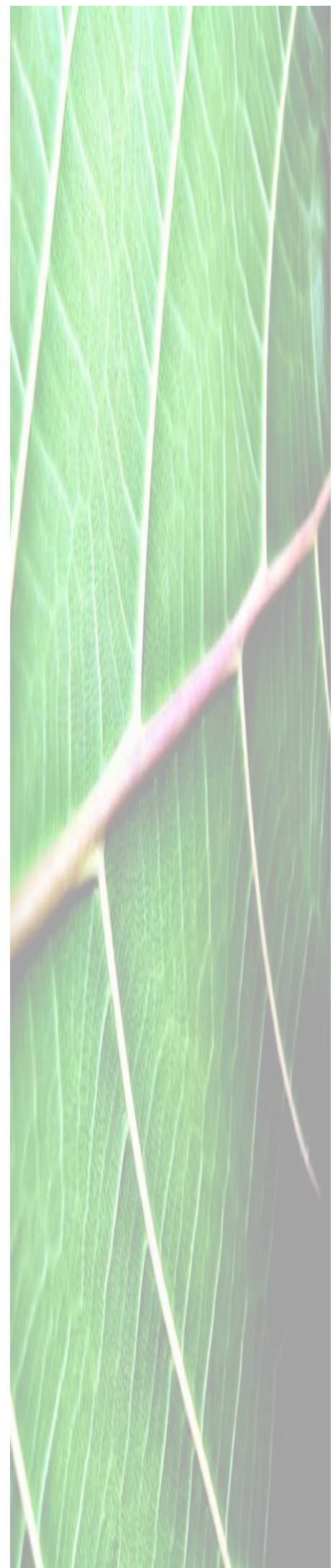
OBJETIVOS



OBJETIVOS

1. Identificar los genes de endo- β -1,4-xilanasas presentes en el genoma de *B. cinerea*.
2. Diseñar una estrategia para el silenciamiento simultáneo de todos los genes codificantes para endo- β -1,4-xilanasas, haciendo uso del fenómeno de interferencia por RNA.
3. Generar las construcciones necesarias para el silenciamiento génico e introducirlas en la cepa silvestre de *B. cinerea* B05.10.
4. Analizar en los transformantes resultantes la eficacia de la estrategia de silenciamiento génico utilizada para silenciar los genes diana, así como el fenotipo de las cepas resultantes.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Hongos

- *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) B05.10 (Büttner et al., 1994): cepa haploide derivada de la cepa SAS56, cedida por el Dr. Paul Tudzynski (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Alemania).

Esta cepa y las generadas en el presente trabajo se conservaron de manera rutinaria a 4°C, en el caso de conservar los conidios, o en medio de extracto de tomate al 25 %, en el caso de conservar sus micelios.

1.2. Bacterias

- *Escherichia coli* (*E. coli*) **XL1-Blue** (Stratagene, La Jolla, CA): *recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ZΔM 15 Tn10* (Tet^r)]

- *Escherichia coli* (*E. coli*) **SURE2** (Stratagene, La Jolla, CA): *e14^(McrA⁻)* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (Kan^r) *uvrC* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r) *Amy Cam^r*]. Esta cepa carece de componentes que catalizan el reordenamiento y delección de estructuras secundarias y terciarias de ADN no convencionales, siendo especialmente útil en el clonaje de secuencias repetidas o complementarias. Cedida gentilmente por el Dr. Diego de la Rosa (Universidad de La Laguna).

Las cepas bacterianas se cultivaron, rutinariamente, en medio LB con los antibióticos requeridos y en condiciones aeróbicas a 37°C y fueron conservadas a -80°C resuspendidas en glicerol al 15%.

1.3. Especies vegetales

- *Nicotiana tabacum* cv. Havana (*N. tabacum*): Variedad de tabaco, cultivada a temperatura ambiente con periodos de luz de 12 horas y una humedad del 70 % hasta alcanzar los 40 cm.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Para el cultivo de *B. cinerea*

- **ME** (Malt Extract): Extracto de malta (Bacto malt extract, DIFCO) al 1 %.

- **MEA (Malt Extract Agar)**: Extracto de malta (Bacto malt extract, DIFCO) al 3 %, agar bacteriológico al 1,5 %.

- **Tomate agar**: Extracto de frutos de tomate al 25 % (p/v) ajustado a pH 5,4 con NaOH, agar 2 %.

- **SH agar**: Sacarosa 0,6 M, HEPES 5 mM pH 6,5, NH₄H₂PO₄ 1mM, agar al 1,2 %.

- **SH top-agar:** Sacarosa 0,6 M, HEPES 5 mM pH 6,5, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1mM, agar 0,6 %.
- **GamXyl:** Gamborg B5 (Duchefa Biochemie B.V., Holanda) al 0,3 %, tampón fosfato 25 mM pH6, xilano 1 %, agar 1,5 %.
- **YGG:** Extracto de levadura (Yeast extract, Panreac) 0,5 %, glucosa 2 %, Gamborg B5 al 0,3 %.

En los casos de cepas resistentes, los medios anteriormente citados, fueron suplementados con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina y/o nourseotricina.

2.2. Para el cultivo de *E. coli*

- **LB (medio Luria y Bertani):** Bactotripton 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 %. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH. Cuando fue necesario se suplementó con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilina o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciclina.
- **LB-agar:** Medio LB suplementado con agar al 1,5%. Cuando fue necesario se añadió 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilina o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciclina.
- **SOB:** Tripton 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,01 M, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10mM.

3. PLÁSMIDOS

3.1. pNDN-OGG y pNAH-OGG: derivados del plásmido pRS426, cedidos por la Dra. Schumacher (Wilhelms-Universität Münster, Alemania), (Schumacher, 2012). Los dos plásmidos contienen un casete de expresión del gen eGFP (gen de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*) controlado por el promotor *oliC* de *A. nidulans* y por el terminador *gluc* de *B. cinerea*. pNDN-OGG (10626 pb) presenta un casete de resistencia a nourseotricina al contener el gen *natI* que codifica para la nourseotricina acetil transferasa bajo control del promotor *trpC* de *Aspergillus nidulans*. En pNAH-OGG (10992 pb), el gen *natI* está sustituido por gen *hph* de *E.coli*, que codifica para la higromicina fosfotransferasa, confiriendo resistencia a la higromicina. Los dos casetes se encuentran flanqueados por dos regiones, del gen *niaD* de *B. cinerea* que codifica para la nitrato reductasa en el caso de pNDN-OGG, y del gen *niiA* que codifica para la nitrito reductasa en pNAH-OGG. Estas regiones serán las responsables de que los plásmidos se integren en el genoma de forma dirigida en el locus *niaD* y *niiA*, respectivamente. Estos plásmidos confieren resistencia a ampicilina como marcador selectivo en procariotas.

3.2. pLOB1: plásmido de 5286 pb cedido gentilmente por el profesor Dr. J.A.L. van Kan (Wageningen Agricultural University, Holanda), que contiene el gen *hph* de *E. coli*, que

codifica para la higromicina fosfotransferasa, bajo el control del promotor *oliC* de *Aspergillus nidulans*. También confiere resistencia a ampicilina como marcador selectivo en procariontas.

4. AISLAMIENTO DE CONIDIAS DE *B. cinerea*

- 1) Inocular placas de tomate agar con conidias conservadas en sílice o a -80°C y mantener 10 a 14 días en la oscuridad a 20°C, exponiendo diariamente las placas durante 5 min a luz ultravioleta cercana.
- 2) Al cabo de este tiempo, cubrir la superficie de la placa con 15 ml de agua estéril, y separar las conidias con ayuda de un asa de siembra de vidrio.
- 3) Filtrar la suspensión obtenida a través de algodón hidrófilo para retirar los restos de micelio y recoger las conidias por centrifugación.
- 4) Lavar las conidias con agua estéril centrifugando durante 5 min a 1500 x g.
- 5) Finalmente, resuspender las conidias en agua estéril y cuantificarlas utilizando un hemocitómetro.

5. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

De manera rutinaria, se utilizó el kit Quick Clean 5M Miniprep (GenScript, U.S.A) siguiendo las instrucciones del fabricante. Únicamente, para casos concretos, se siguieron otros dos protocolos que se describen a continuación.

5.1. Método TENS

Utilizado para llevar a cabo rastreos en busca de clones positivos en los clonajes realizados en vectores plasmídicos. El proceso de extracción se efectuó de la siguiente manera:

- 1) Centrifugar 1,5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda una noche a 37°C, decantar el sobrenadante y resuspender las células en el líquido residual.
- 2) Anadir 300 µl de disolución TENS (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5%), mezclar por inversión del tubo y añadir 150 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2.
- 3) Mezclar nuevamente por inversión, centrifugar los tubos durante 2 min a 15,6 x g y añadir, al sobrenadante recuperado, 0,9 ml de etanol absoluto a -20°C.
- 4) Centrifugar 5 min, lavar el sedimento con etanol al 70% y resuspender el ADN en 20 µl de H₂O estéril.

5.2. Extracción a gran escala.

La purificación de ADN plasmídico a gran escala se llevó a cabo siguiendo una modificación del método descrito por Sambrook *et al.* (Sambrook and Russell, 2001), tal y como se describe a continuación:

- 1) Recoger por centrifugación las células de un cultivo bacteriano de 200 ml crecido durante una noche a 37°C y resuspenderlas en 4,5 ml de GTE (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM).
- 2) Agregar 9 ml de la disolución NaOH-SDS (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y después de 5 min en hielo, añadir 6,75 ml de acetato potásico 5M pH 4,8.
- 3) Mantener los tubos en hielo durante otros 5 min y centrifugar durante 10 min a 15.000 rpm en una centrífuga Beckman equipada con rotor JA-14.
- 4) Filtrar el sobrenadante recuperado a través de papel de filtro, añadir 12 ml de isopropanol y mezclar por inversión.
- 5) Tras 10 min a temperatura ambiente, centrifugar con las mismas condiciones descritas anteriormente.
- 6) Lavar el precipitado con etanol al 70%, resuspender en 1 ml de agua e incubar durante 10 min con 100 µg de RNasa (10 mg/ml) en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM.
- 7) Se trataron las muestras con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y precipitar el ADN presente en la fase acuosa añadiendo un décimo del volumen de acetato sódico (3M, pH 5,2) y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C.
- 8) Finalmente, resuspender el ADN precipitado en 100 µl de agua estéril.

6. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

Los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación realizadas en este trabajo, fueron suministrados por Life Technologies (Paisley, Scotland) y sus secuencias se encuentran recogidos en la Tabla 1.

La polimerasa Phusion (FINNZYMES) se usó para amplificar fragmentos de DNA que fuesen a ser clonados y, en el resto de los casos, se utilizó la polimerasa Taq (GenScript). El protocolo básico seguido en cada uno de los casos se detalla en la Tabla 2.

7. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados utilizando el kit de purificación Quickclean PCR purification kit (Genscript, U.S.A) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Para purificar fragmentos de ADN de geles de agarosa, se utilizó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymo Research, U.S.A) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Relación de cebadores utilizados en este trabajo. En las secuencias se señalan la/s diana/s de restricción introducida/s.

Nombre	Secuencia (5' →3')
XYL-FW(NcoI)	ATCCCATGGAACCGCGACTTTTAACCAG
XYL-RV(BamHI + NotI)	CTACGATGCGGCCGCGACGATGGATCCTTCGCTGGGGGTGGAGCC
XYL-FW(BamHI + NotI)	CTACGATGCGGCCGCGACGATGGATCCAACCGCGACTTTTAACCAG
XYL-RV(NcoI)	TAGCCATGGTTCGCTGGGGGTGGAGC
XYL-FW(NotI)	CTACGATGCGGCCGCAACCGCGACTTTTAACCAG
LINK-RV(BamHI)	CGATGGATCCTTAATTAAGGCCGGCCG
NOUR-RV-check	CAGGCGCTCTACATGAGC
NR-FW-check	AGGATGGTTTGGTTTCGG
NR-MBD-SMA	TCCCCGGGTTTACCATGATCGGGTCCA
NR-MBD-BAM	CGGGATCCACCTCCTTTAAGCGCTTT
NiiA-B05-FW	AAGATACACGCATATCGG
NiiA-B05-RV	GATTTTTGACTTCTTGGC
NiiA-FW-check	GGTGACAGTGAAGGATGC

Tabla 2. Ciclos y temperaturas utilizadas en las reacciones de amplificación por PCR con las polimerasas *Taq* y *Phusion*.

Nº ciclos	Descripción	<i>Taq</i>		<i>Phusion</i>	
		Temperatura	Duración	Temperatura	Duración
1x	Desnaturalización	95°C	30 s	98°C	30 s
9x	Desnaturalización	95°C	15 s	98°C	(5-10) s
	Anillamiento	Ta*	30 s	Ta	30 s
	Extensión	68°C	Te**	72°C	Te
19x	Desnaturalización	95°C	15 s	98°C	30 s
	Anillamiento	Ta	30 s	Ta	30 s
	Extensión	68°C	Te + 3 s extra en cada ciclo	72°C	Te + 2 s extra en cada ciclo
1x	Extensión extra	68°C	10 min	72°C	10 min
1x		18°C	indefinido	18°C	indefinido

*Ta: Temperatura de anillamiento; **Te: Tiempo de elongación.

9. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*

Se siguió el protocolo de Sambrook *et al.* (Sambrook and Russell, 2001).

9.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

- 1) Inocular 2 ml de LB suplementado con tetraciclina (10 µg/ml) con una colonia de la correspondiente cepa de *E. coli*, previamente crecida en una placa de LB-agar con tetraciclina, e incubar toda la noche a 37°C.
- 2) Utilizar este cultivo para inocular tres matraces con 200 ml de medio SOB cada uno de ellos, con 0,1, 0,4 y 0,6 ml del preinóculo e incubar a 18-20°C con agitación hasta que uno de los cultivos alcance una densidad óptica de 0,4-0,6 a 600 nm.
- 3) Incubar las células en un baño de hielo durante 10 min y recogerlas por centrifugación a 800 x g durante 10 min.
- 4) Resuspender el sedimento en 40 ml de tampón TB (Hepes-KOH 10 mM pH 6,7, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM) a 0°C, incubar durante 10 min en hielo y recoger de nuevo las células por centrifugación.
- 5) Resuspender el sedimento en 16 ml de TB frío, mezclar con 1,2 ml de dimetilsulfóxido y distribuir las células competentes en alícuotas de 0,1 ml.
- 6) Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y conservar a -80°C hasta el momento de su uso.

9.2. Transformación de *E. coli* por choque térmico

- 1) Descongelar una alícuota de células competentes en un baño de hielo, añadir el ADN en un volumen menor o igual a 10 µl e incubar la mezcla en hielo durante 10 min.
- 2) Incubar durante 90 segundos a 42°C, y mantener durante otros 2 min en hielo.
- 3) Anadir 1 ml de LB, incubar durante una hora a 37°C y sembrar las células en placas de LB-agar con los antibióticos adecuados.

10. PCR DE COLONIAS

- 1) A partir de un cultivo en medio sólido de *E. coli*, picar cada colonia con un palillo estéril.
- 2) Resuspender las células en 25 µl de agua estéril, agitando el palillo y haciéndolo girar durante 5".
- 3) Utilizar en la reacción de PCR 5 µl de la suspensión bacteriana y seguir el protocolo general de amplificación por PCR descrito en el apartado 6 de esta sección.

11. TRANSFORMACIÓN DE *B. cinerea*

11.1. Obtención de protoplastos

Este método está basado en el protocolo descrito por Hamada *et al.* (Hamada et al., 1994) y modificado por van Kan *et al.* (Van Kan et al., 1997).

- 1) Inocular 300 ml de ME con una suspensión de conidias a una concentración final de $1,5 \times 10^6$ conidias/ml e incubar durante 16-20 horas a 20°C a 180 rpm en un agitador rotatorio.
- 2) Recoger el micelio por filtración en un kitasato estéril y lavarlo 2 veces con disolución KC (KCl 0,6 M, CaCl₂ 50 mM).
- 3) Resuspender en 50 ml de disolución KC suplementada con Glucanex (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 7,5 mg/ml e incubar durante 2 horas a 20°C con el mismo agitador del paso 1 a 140 rpm, comprobando la formación de protoplastos cada 30 min.
- 4) Filtrar la suspensión para eliminar el micelio sin digerir, primero a través de tejido de nylon con un diámetro del poro de 25 µm y, posteriormente, de 10 µm y sedimentar los protoplastos obtenidos por centrifugación durante 10 min a 100 x g.
- 5) Lavar el sedimento con disolución KC y resuspender los protoplastos en esta misma disolución a una concentración final de 10^8 protoplastos/ml.

11.2. Transformación de los protoplastos

- 1) Precipitar 5 µg del ADN transformante con acetato potásico 5 M pH 4,8/etanol, resuspender en 95 µl de disolución KC e incubar durante 5 min en hielo.
- 2) Añadir 5 µl de espermidina (Sigma-Aldrich) 5 mM y, después de incubar en hielo durante 5 min, añadir 100 µl de la suspensión de protoplastos e incubar la mezcla otros 5 min en las mismas condiciones.
- 3) Mezclar con 100 µl de una disolución al 25% de polietilenglicol 3350 (Sigma-Aldrich) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y CaCl₂ 50 mM e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- 4) Transcurrido este tiempo, añadir 500 µl de la disolución de polietilenglicol y mantener durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, añadir 200 µl de disolución KC.
- 5) Separar en dos mitades la mezcla de transformación y resuspender cada una de ellas en 100 ml de SH-agar precalentado a 46°C y dispensar inmediatamente en placas de Petri.
- 6) Tras 20 horas de incubación a 20°C, cubrir las placas con un volumen de aproximadamente 15 ml/placa de SH-agar suplementado con 100 µg/ml de nourseotricina o higromicina (Duchefa) e incubar a 20°C durante 4 o 5 días más.
- 7) Transferir las colonias transformantes a placas de MEA suplementadas con 100 µg/ml del antibiótico requerido e incubar a 20°C durante 2-3 días.

12. ENSAYO DE VIRULENCIA DE *B. cinerea*

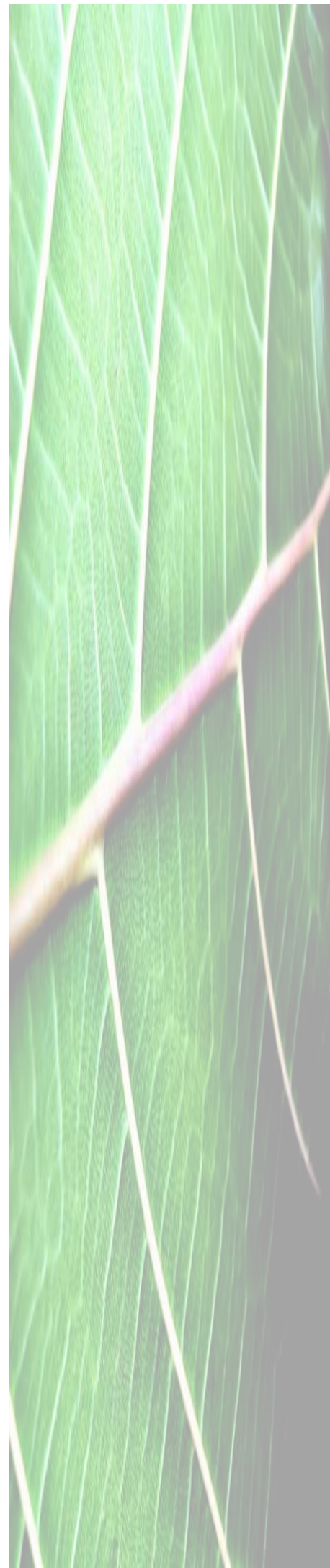
- 1) Disponer hojas cortadas de tabaco sobre papel de filtro humedecido con agua estéril.

- 2) Recortar un pequeño fragmento de agar con micelio de una placa de Petri en la que previamente se creció la cepa a ensayar.
- 3) Colocar los fragmentos de agar sobre la superficie de la hoja e incubar a 20°C, en recipientes cerrados en condiciones de alta humedad.
- 4) Registrar el avance de la infección cada 24 horas y medir el radio de los halos de infección obtenidos.

13. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *B. cinerea*

- 1) Inocular 1 ml de YGG con una porción de agar con micelio e incubar durante tres días a 20°C y con agitación.
- 2) Al cabo de este tiempo, centrifugar, eliminar el sobrenadante y añadir 1 ml de agua estéril para lavar el micelio y centrifugar.
- 3) Resuspender el micelio en 300 µl de TES-S (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM) y añadir bolas de vidrio de 0,5 µm de diámetro, hasta el menisco formado por el líquido.
- 4) Homogeneizar el micelio en un FastPrep-24MP BeadBeater (60 s a 6 m/s).
- 5) Añadir 200 µl de TES-S, 50 µl de SDS al 20% y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml), agitar bien e incubar 30 min a 60°C.
- 6) Agujerear el fondo del tubo con una aguja al rojo, colocar sobre un tubo eppendorf sin tapa y centrifugar 5 min a 7000 rpm en una microfuga de mesa.
- 7) Pasar 500 µl del filtrado a un nuevo tubo, añadir 194 µl de NaCl 5 M y 69.4 µl de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 10% e incubar durante 10' a 65°C.
- 8) Añadir 700 µl de SEVAG (cloroformo:isoamílico 24:1), mezclar suavemente (vórtex 1'') e incubar durante 30' a 0°C.
- 9) Centrifugar 30'' y transferir 800 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo y volver a centrifugar 10' a 4°C y 13500 rpm en una centrífuga Beckman equipada con rotor JA-14.
- 10) Transferir 650 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir 325 µl acetato amónico 5M, mezclar suavemente y congelar a -70°C al menos 30'.
- 11) Dejar descongelar y centrifugar 10' en las mismas condiciones que en el punto 9.
- 12) Transferir 900 µl del sobrenadante a un tubo nuevo e incubar con RNAsa (2 µl 10 mg/ml) en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM, durante 15' a 37°C.
- 13) Añadir 0,55 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA y centrifugar inmediatamente durante 5' en las mismas condiciones que en el punto 9.
- 14) Lavar 2 veces el DNA precipitado con etanol al 70% y secar en el Speed-Vac.
- 15) Resuspender, finalmente el DNA genómico en 100 µl de agua estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENÓMA DE *B. cinerea*

1.1. Identificación de los genes que codifican para endo- β -1,4 xilanasas en el genoma de *B. cinerea*

En la actualidad, se dispone de tres bases de datos distintas del genoma de *B. cinerea*, correspondientes dos de ellas a la secuenciación del genoma de la cepa B05.10 (Amselem et al., 2011; Staats and van Kan, 2012) y la tercera a la secuenciación del genoma de la cepa T4 (Amselem et al., 2011). Los códigos de acceso de los genes en estas bases de datos son: para la cepa *B. cinerea* B05.10, códigos BC1G.... y B0510...., y para la cepa *B. cinerea* T4, códigos BofuT4...

El conocimiento del genoma completo del hongo permite el análisis de la posible presencia de genes codificantes para otras xilanasas, además de la Xyn11A (Brito et al., 2006). Las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) provocan la ruptura del esqueleto de xilano rompiendo enlaces entre moléculas de xilosa y pertenecen, la gran mayoría de ellas, a las familias 10 (GH10) y 11 (GH11) de las glicosil hidrolasas (Cantarel et al., 2009), según la clasificación en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes, www.cazy.org), aunque también se han descrito algunas en las familias 5, 7, 8 y 43 (Collins et al., 2005). Por ello, se realizó una búsqueda en las bases de datos del genoma de *B. cinerea* utilizando los dominios que el servidor Pfam (Bateman et al., 2004) define como característicos para cada una de estas dos familias de glicosil hidrolasas, a través de las herramientas bioinformáticas disponibles en la web del Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/ToolsIndex.html). Con las secuencias identificadas se realizaron alineamientos entre ellas, utilizando el servidor ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), con el fin de analizar sus similitudes. Para estimar el porcentaje de identidad entre secuencias, se utilizó el servidor EMBOSS Stretcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/). Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

- Xilanasas de la familia GH10

Se identificaron un total de 4 genes que codificaban para posibles glicosil hidrolasas de la familia 10. Tres de estos genes aparecen en las dos secuenciaciones del genoma de la cepa B05.10, BC1G_00576.1, BC1G_01778.1 y B0510_1817, y el último, BcT4_8157, en la secuenciación de la cepa T4. Todos los genes tienen una longitud de 1584 pb, exceptuando el gen BC1G_00576.1 que es ligeramente mayor (1594 pb).

El siguiente paso del estudio consistió en alinear la secuencia de estos genes para analizar si se trataban de las mismas secuencias o si las anotaciones correspondían a genes distintos.

Los resultados del alineamiento (Anexo I) revelaron que las secuencias BC1G_01778.1, B0510_1817 y BcT4_8157, en realidad corresponden al mismo gen, pero el gen anotado como BC1G_00576.1, es diferente (Anexo I). El porcentaje de identidad entre estos dos genes resultó ser del 46,8%.

Esta diferencias entre cepas respecto a la presencia de una mayor cantidad de genes en una secuenciación frente a la otra, se puede deber a que en la cepa B05.10 el 97,3% del genoma pudo ser alineado, mientras que en la cepa T4 fue el 96,5%. (Staats and van Kan, 2012).

Se, concluye, por tanto, que existen en el genoma de *B. cinerea* 2 genes que codifican para xilanasas de la familia GH10, BC1G_00576.1 y BC1G_01778.1. Las secuencias de los genes, de las posibles proteínas que codifican y los alineamientos realizados entre ellas están recogidas en el Anexo I.

- Xilanasas de la familia GH11

Se identificaron un total de 8 genes que codifican proteínas pertenecientes a la familia 11 de las glicosil hidrolasas. Cinco de estos genes se identificaron en la secuenciación de la cepa B05.10 (BC1G_13645.1, BC1G_03590.1, B0510_640, B0510_3175 y B0510_2491) y los tres restantes, en la secuenciación de la cepa T4 (BcT4_797, BcT4_9475 y BcT4_5561). Los genes tienen longitudes variables, comprendidas entre 738 pb y 1170 pb.

El estudio de los alineamientos realizados entre estas 8 secuencias (Anexo I) permitió obtener las siguientes conclusiones. Las secuencias BC1G_13545.1, B0510_2491 y BCT4_5561 corresponden, en realidad, al mismo gen, teniendo un porcentaje de identidad del 100% (Anexo I). Similares resultados se obtuvieron al comparar entre sí las secuencias BC1G_03590.1, B0510_3175 y BCT4_797 y también al comparar entre ellas las secuencias de los genes B0510_640 y BCT4_797 (Anexo I). Se identificaron, por tanto, 3 genes distintos, BC1G_03590.1, BC1G_13645.1 y B0510_640, que codifican para glicosil hidrolasas de la familia 11 distintas. El porcentaje de identidad que se obtuvo al comparar las secuencias de estos tres genes se recoge en la Tabla 3 y las secuencias de los genes, de las posibles proteínas que codifican y los alineamientos realizados están descritas en el Anexo 1.

Tabla 3. Porcentaje de identidad entre los genes de la familia GH11.

genes	BC1G_03590.1/ B0510_3175/ BcT4_9475	BC1G_13645.1/ B0510_2491/BCT4_5561	B0510_640/ BCT4_797
BC1G_03590.1/ B0510_3175/ BcT4_9475	...	39,5	42,3
BC1G_13645.1/ B0510_2491/BCT4_5561	54,0

A partir de este análisis, se concluye, por tanto, que en el genoma de *B. cinerea* se han identificado 5 genes que codifican para endo- β -1,4-xilanasas (presentes tanto en la cepa B05.10 como en la cepa T4), dos de ellas pertenecientes a la familia 10 y las tres restantes a la familia 11 de las glicosil hidrolasas.

1.2. Análisis *in silico* de las proteínas pertenecientes a las familias GH10 y GH11

En primer lugar, se comprobó la presencia de secuencia señal en las cinco xilanasas para las que codifica el genoma de *Botrytis cinerea* con el fin de corroborar que todas ellas son proteínas secretadas al medio extracelular. Para ello se utilizó el servidor SignalP4.1 (Petersen et al., 2011), que predice además, el sitio de corte del péptido. Los resultados obtenidos indicaron que todas las xilanasas tienen péptido señal (Anexo I), confirmando que las secuencias identificadas en este estudio corresponden a proteínas que entran en la ruta de secreción.

También se analizó la posibles similitud entre estas proteínas (los alineamientos de las secuencias se recogen en el Anexo I de la presente memoria) Entre las dos xilanasas de la familia GH10 se encontró un porcentaje de identidad del 28.2% y de similitud del 36.0%. Los porcentajes de identidad y similitud obtenidos al analizar, dos a dos, las 3 xilanasas identificadas de la familia GH11 se recogen en la Tabla 4. De entre ellas, la codificada por el gen BcT4_797 corresponde a la endo- β -1,4-xilanasasa Xyn11A, caracterizada por factor de patogenicidad en estudios previos (Brito et al., 2006), capaz de inducir la respuesta hipersensible en la planta, independientemente de su actividad enzimática (Noda et al., 2010).

Tabla 4. Porcentajes de identidad y de similitud entre los xilanasas de la familia GH11

Proteínas	Identidad (%)	Similitud (%)
BC1G_13645.1/ BC1G_03590.1	32,6	48,3
BC1G_13645.1/ BcT4_797	44,3	61,7
BC1G_03590.1/BcT4_797	48,8	60,2

1.3. Diseño de un gen quimérico para inducir el silenciamiento de las 5 xilanasas de *B. cinerea*

Para inducir el silenciamiento génico es necesario provocar la síntesis en la célula de una molécula de RNA pequeña de doble cadena específica para el gen diana que se desea silenciar. El objetivo del presente trabajo es provocar el silenciamiento, utilizando la estrategia conocida como *building block*, simultáneamente de las 5 xilanasas cuyos genes han sido detectados en el genoma del *Botrytis cinerea*. Para ello, en primer lugar se identificaron regiones de 20-50 nt en cada uno de los genes seleccionados, utilizando el servidor

SVMRNAi2.0 (<http://www.changbioscience.com/stat/sirna.html>), que cumplieran requisitos básicos para que pudieran actuar como siRNAs (Petri and Meister, 2013) (Tafer, 2014). Entre estos requisitos destacan el contenido de G+C, que debe estar entre el 30-52%, la ausencia de regiones con repeticiones consecutivas de una base y de regiones que contengan SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) en su secuencia, y la estructura formada en la región 5', entre la secuencia y el RNA a silenciar, debe ser más estable que en la región 3' (Tafer, 2014). En base a estos criterios, el servidor selecciona varias regiones de 21 nt en cada gen, y a cada una le asigna una puntuación. En este trabajo, se seleccionaron las regiones de 21 nucleótidos con puntuación más alta para cada uno de los 5 genes codificantes para xilanasas que se desean silenciar (Anexo I, Tabla 5). Además, se decidió ampliar cada una de estas regiones en 13-14 nucleótidos de la secuencia del gen correspondiente en cada extremo, para poder facilitar el posterior clonaje y manipulación de la construcción resultante. De esta forma, se utilizó un fragmento de 50 nt específico para cada una de las xilanasas en la construcción del gen quimérico silenciador (Tabla 5).

La secuencia final resultante de la combinación de las regiones recogidas en la Tabla 5 dio lugar a un gen quimérico (Fig. 1A, Anexo I), al que se añadió en el extremo 3' una región de 22 nucleótidos, que introduce dianas para las enzimas de restricción *SacI*, *FseI* y *PacI* y, que al mismo tiempo, va a servir como región espaciadora, sin homología, en la estrategia de silenciamiento tallo-bucle. (Fig. 1B). La secuencia se utilizó para realizar una búsqueda Blast en la web del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y así corroborar que la construcción resultante no tenía homología con otras secuencias de DNA que pudieran dar lugar al silenciamiento de otros genes no deseados.

Tabla 5. Secuencias utilizadas en la construcción del gen quimera silenciador. Código de acceso de cada gen (ID); familia de glicosil hidrolasa (GH); secuencia (en rojo la región de 21 nt elegida como siRNA) y las posiciones 5' (inicio) y 3' (final) de cada secuencia en cada uno de los genes.

ID	GH	Secuencia	Inicio	Final
BC1G_13645.1	11	5'-AACCGCGACTTTT AACCAGTACATC TCGGTGCGAT TCTTCCCCGCGGAAAA-3'	555	604
BC1G_03590.1	11	5'-AGGTGGTGATAGTGG AAGTCCTACCT CGGCTCCCACT ACTTCTCCTACAA-3'	928	977
B0510_640	11	5'-TCCGTCCGTACTAGC AAGCGTACGAG CGGTACCGTC ACCACTGCAAACCA-3'	589	639
BC1G_00576.1	10	5'-GCGGCTGTCATCA AAGCAA ACTTTG GACAAGTGA CACCAGAAAACAGCAT-3'	505	554
BC1G_01778.1	10	3'-TTGTAGGCGGGGTG AACGGTATAG TTAGCGTACCA GAGACAGGCATCACC-5'	1054	1103
BC1G_01778.1	10	5'-ACGGTGTCGGTCTCC AAGCCCACTT CATCGTCGGCT CCACCCCCAGCGAA-3'	770	819

La secuencia fue sintetizada químicamente (GeneScript) y suministrada en el plásmido pUC57-6CXs.

A)

5' **AACCGCGACTTTTAACCAAGTACATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGGAAAAA** **GGTGGTGATAGTGGAGATCCTACCTCGGCTCCCACTACTTCTCCTACAATCCGTCCGTA** **CTAGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCACCACTGCAAACAGCGGCTGTCATCAAAGCAAACCTTTGGACAAGTGACACCAGAAAAACAGCATTGTTAGGCGGGGTGAACGGTATAGTTAGCGTACCAGAGACAGGCATCACCACGGTGTCCGGTCTCCAAGCCCCTTCATCGTCCGGCTCCACCCCAAGCGAA** **GAGCTCGGCCGGCCTTAATTAA**-3'

B)



Figura 1. Gen quimérico Hom_XyL. A) Secuencia completa del gen quimérico. Con diferentes colores se señalan las regiones correspondiente a cada gen de los 5 que codifican para xilanasas; en verde y subrayado, secuencia espaciadora. B) Esquema del gen quimérico. Cada segmento corresponde a 50 pb de los genes que se indican en cada caso. ESP: secuencia espaciadora.

2. OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS TRANSFORMANTES CONTENIENDO Hom_XyL

2.1. Construcción del plásmido pNDN-XyL

Este plásmido deriva del vector pNDN-OGG (Schumacher, 2012), que contiene el casete de resistencia a nourseotricina como marcador selectivo, además de un casete de expresión, entre dos regiones homólogas al gen *niaD* responsables de dirigir la integración del mismo en el locus *niaD* del genoma de *Botrytis* (Fig. 2).

Para la construcción del plásmido pNDN-Xyl (Fig. 2), se amplificó la región Hom_XyL sin la secuencia espaciadora a partir del plásmido pUC57-6CXs utilizando los cebadores XYL-FW(Nco1) y XYL-RV(BamH1+Not1) (Tabla 1), que introducen dianas para las enzimas de restricción que se indican en sus respectivos nombre a ambos extremos de la secuencia. El fragmento amplificado de 336 pb (Fig. 2) fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* y ligado con el vector pNDN-OGG previamente digerido con las mismas enzimas (Fig. 2).

El producto de la ligación se usó para transformar células de *E. coli* y las colonias resultantes fueron analizadas para comprobar la existencia del plásmido por PCR de colonias, utilizando los mismo cebadores XYL-FW (Nco1) y XYL-RV(BamH1+Not1) (Fig. 2). En aquellos casos en que se amplificó el fragmento esperado de 336 pb, se crecieron las cepas correspondientes, se purificó el DNA plasmídico y se corroboró por digestión con enzimas de

restricción, la presencia de esta región en el plásmido (Fig. 2) El plásmido resultante se denominó pNDN-XyL (Fig. 2).

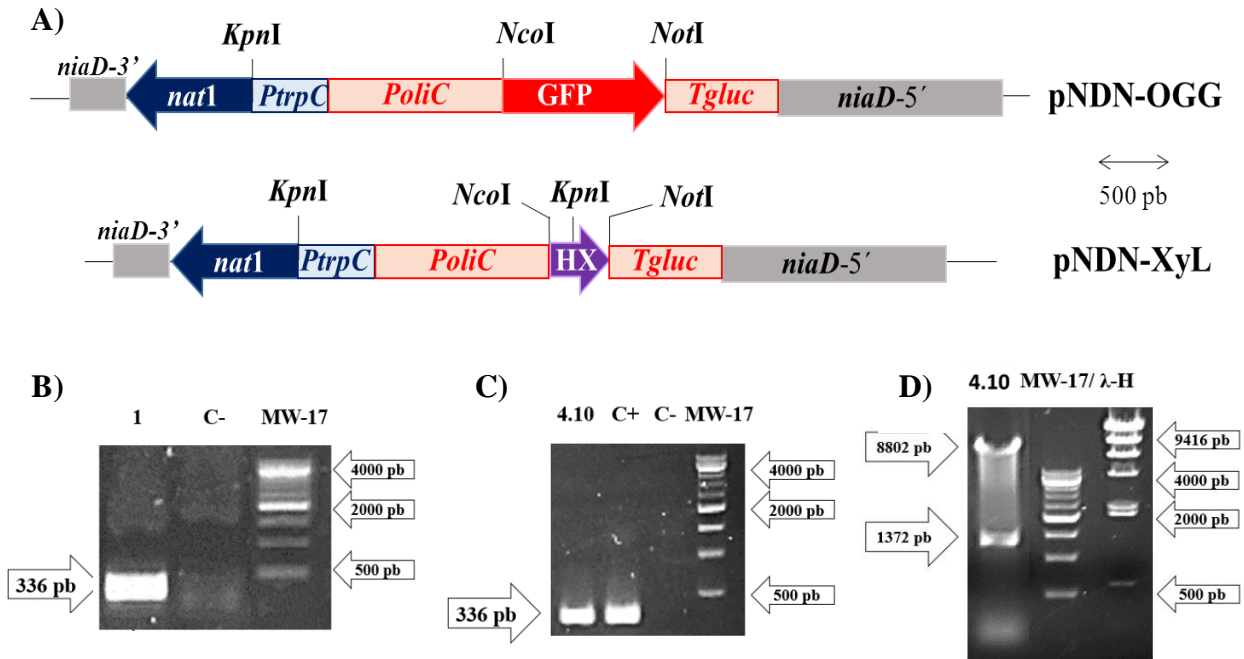


Figura 2. Construcción del plásmido pNDN-XyL. A) Esquema de los plásmidos pNDN-OGG y pNDN-XyL. *niaD-3'* y *niaD-5'*, regiones flanqueantes 3' y 5', respectivamente del gen *niaD* de *B. cinerea*; *nat1*, gen de resistencia a la nourseotricina; *PtrpC*, promotor *trpC* de *A. nidulans*; *PoliC*, promotor *oliC* de *A. nidulans*; *GFP*, gen de la proteína verde fluorescente; *Tgluc*, terminador *gluc* de *B. cinerea*; *HX*, gen quimérico silenciador *Hom_XyL*, sin región espaciadora. B) Electroforesis del fragmento de 336 pb amplificado con los cebadores XYL-FW (*NcoI*) y XYL-RV (*BamHI*+*NotI*), a partir del plásmido pUC57-6cxs (1); control negativo de la reacción de PCR sin DNA (C-). C) Electroforesis de la PCR a partir de una colonia con los mismos cebadores que en B), de un clon positivo (4.10); control positivo de la amplificación con los mismos cebadores a partir del plásmido pUC57-6cxs (C+); control negativo de la reacción de PCR sin DNA (C-). D) Electroforesis de la digestión del plásmido del clon 4.10 con *KpnI* (4.1). MW-17 y λ -H: Marcadores de peso molecular. Todas las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 0,7 %.

2.2. Construcción del plásmido pNAH-XyL

La construcción del plásmido pNAH-XyL (Fig. 3) se realizó siguiendo los mismos pasos que para la construcción de pNDN-XyL, con las excepciones del vector utilizado para el clonaje, los cebadores y las enzimas de restricción utilizadas. El fragmento *Hom_XyL* sin secuencia espaciadora se amplificó por PCR (Fig. 3) usando los cebadores XYL-FW (*BamHI*+*NotI*) y XYL-RV (*NcoI*) (Tabla 1), que introducen dianas para las enzimas de restricción indicadas en sus nombres en los correspondientes extremos del fragmento. Después de ser digerido con *NcoI* y *NotI*, fue clonado en los mismos lugares de restricción en este caso, del vector pNAH-OGG (Fig. 3). pNAH-OGG (Schumacher, 2012) contiene el casete de resistencia a higromicina como marcador selectivo, además de un casete de

expresión, entre dos regiones homólogas al gen *niiA* responsables de dirigir la integración del mismo en el locus *niiA* del genoma de *Botrytis*.

En el rastreo por PCR de colonia de los transformantes de *E. coli*, se utilizaron los cebadores XYL-FW(BamHI+NotI) y XYL-RV(NcoI) (Fig. 3) y los plásmidos obtenidos a partir de los clones positivos, se digirieron con las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI* para corroborar los resultados de la PCR. El plásmido resultante se denominó pNAH-XyL, que se diferencia de pNDN-XyL, en que el fragmento Hom_XyL está clonado en la orientación contraria y en que el casete de resistencia que contiene es que confiere resistencia a higromicina (Fig. 3).

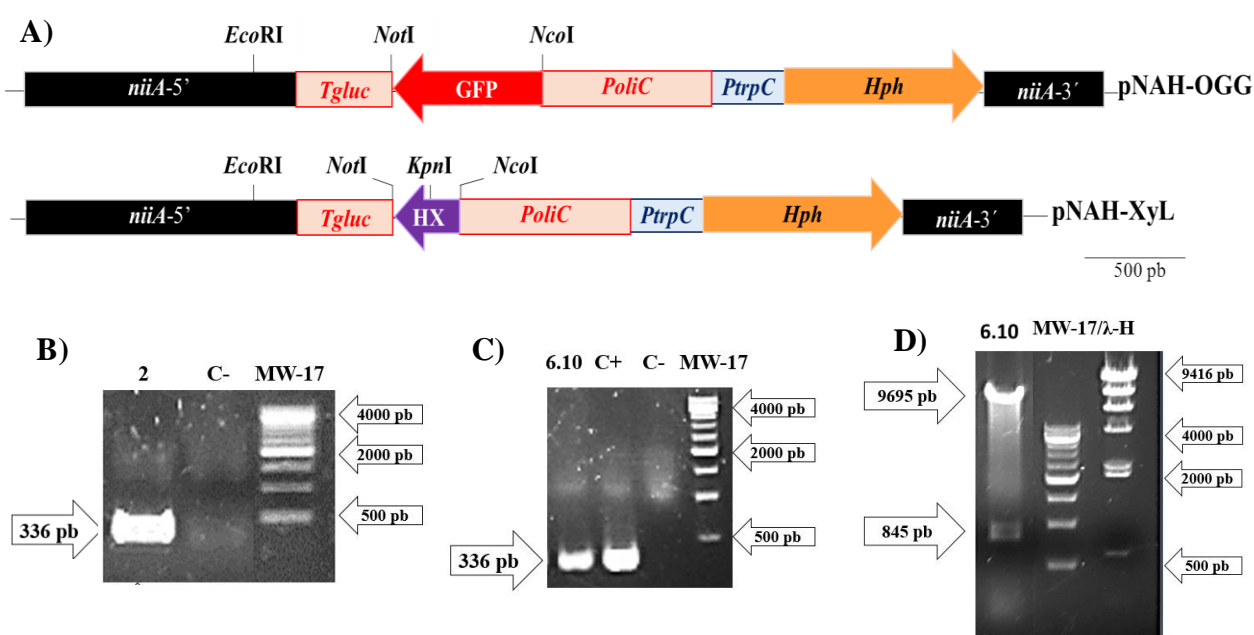


Figura 3. Construcción del plásmido pNAH-XyL. A) Esquema de los plásmidos pNAH-OGG y pNAH-Xyl. *niiA-3'* y *niiA-5'*, regiones flanqueantes 3' y 5', respectivamente del gen *niiA* de *B. cinerea*; *nat1*, gen de resistencia a la nourseotricina; *PtrpC*, promotor *trpC* de *A. nidulans*; *PoliC*, promotor *oliC* de *A. nidulans*; GFP, gen de la proteína verde fluorescente; *Tgluc*, terminador *gluc* de *B. cinerea*; *HX*, gen quimérico silenciador Hom_XyL, sin región espaciadora B) Electroforesis del fragmento de 336 pb amplificado con los cebadores XYL-FW(BamHI+NotI) y XYL-RV(NcoI) a partir del plásmido pUC57-6cxs (2); control negativo de la reacción de PCR sin DNA (C-). C) Electroforesis de la PCR a partir de una colonia, con los mismos cebadores que en B), de un clon positivo (6.10); control positivo de la amplificación con los mismos cebadores a partir del plásmido pUC57-6cxs, (C+); control negativo de la reacción de PCR sin DNA (C-). D) Electroforesis de la digestión del plásmido del clon 6.10 con *KpnI* y *EcoRI* (6.10). MW-17 y λ -H: marcadores de peso molecular. Todas las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 0,7 %.

2.3. Construcción del plásmido pNDN-XyL-Tail

Este plásmido se construyó para llevar a cabo la estrategia de silenciamiento por el método de tallo-bucle y deriva del plásmido pNDN-XyL, en el que se ha clonado una nueva

copia del fragmento Hom_XyL, esta vez con la secuencia espaciadora, de manera que se integre en la orientación contraria a la existente en el plásmido (Fig. 4).

Para ello, el fragmento Hom_XyL fue obtenido por amplificación por PCR a partir de pUC57-6CXs, en esta ocasión con los cebadores XYL-FW(NotI) y LINK-RV(BamHI) (Tabla 1), que introducen dianas para *NotI* y *BamHI*, respectivamente. El producto de esta amplificación, un fragmento de 347 pb (Fig. 4) fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI*, y ligado con el vector pNDN-XyL, previamente digerido con las mismas enzimas. El producto de la ligación se usó para transformar células SURE-2 de *E. coli*, pero en este caso, el rastreo de clones positivos no se realizó por PCR de colonias ya que los productos de amplificación pueden formar una estructura en bucle por la existencia de regiones repetidas invertidas, que impiden la unión del cebador y la posterior amplificación. Los transformantes fueron crecidos en LB y se extrajo el DNA plasmídico para caracterizar los plásmidos según su mapa de restricción (Fig. 4). El plásmido resultante se denominó pNDN-XyL-Tail.

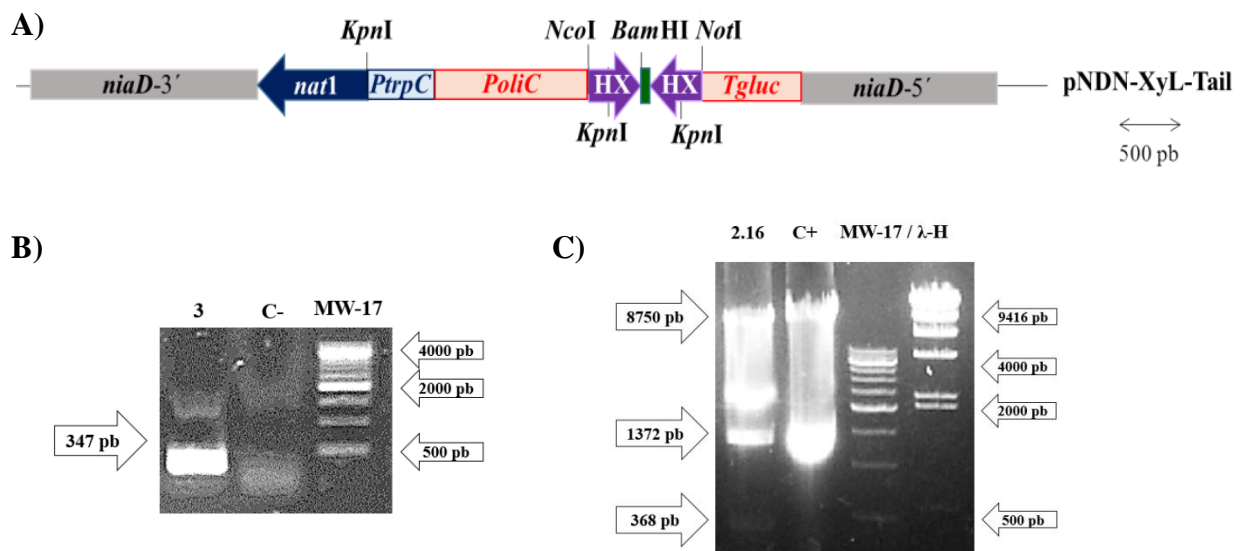


Figura 4. Construcción del plásmido pNDN-XyL_Tail. A) Esquema del plásmido pNDN-XyL-Tail, derivado de pNDN-XyL; *niaD-3'* y *niaD-5'*, regiones flanqueantes 3' y 5', respectivamente del gen *niaD* de *B. cinerea*; *nat1*, gen de resistencia a la nourseotricina; *PtpC*, promotor *trpC* de *A. nidulans*; *PoliC*, promotor *oliC* de *A. nidulans*; *GFP*, gen de la proteína verde fluorescente; *Tgluc*, terminador *gluc* de *B. cinerea*; *HX*, gen quimérico silenciador Hom_XyL; segmento verde, región espaciadora. B) Electroforesis del fragmento de 347 pb amplificado con los cebadores XYL-FW(NotI) y LINK-RV(BamHI) a partir del plásmido pUC57-6cxs, (3); control negativo de la reacción de PCR sin DNA (C-). C) Electroforesis de la digestión del plásmido del clon 2.16 (2.16) y del plásmido pNDN-XyL (C+) con *KpnI*. MW-17 y λ -H: marcadores de peso molecular. Todas las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 0,7 %.

3. TRANSFORMACIÓN DE *B. cinerea*

Una vez obtenidos los plásmidos pNDN-XyL, pNAH-XyL y pNDN-XyL-Tail, se procedió a transformar protoplastos de *Botrytis cinerea* con cada uno de estos vectores por separado. La integración en el genoma de los tres se espera que sea dirigida al locus *niaD*, en el caso de los plásmidos pNDN-Xyl y pNDN-XyL-Tail, o al locus *niaA*, en el caso de pNAH-OGG.

En cada transformación se utilizó al menos 1 µg de DNA plasmídico, que fue previamente digerido con *HindIII*. Esta enzima de restricción provoca la linealización de los plásmidos al tener todos ellos una única diana de corte fuera de la estructura transformante. La estructura lineal del DNA transformante favorece la integración en el genoma (Noda et al., 2007). Los transformantes fueron seleccionados en presencia de nourseotricina o higromicina, dependiendo del plásmido utilizado en la transformación, y después de tres días a 20°C, los positivos fueron sembrados en MEA suplementado con el correspondiente antibiótico. Se seleccionaron de esta forma para su posterior confirmación y caracterización, 12 transformantes procedentes de la transformación con el plásmido pNDN-XyL-Tail, a los que se les denominó Bc-pNDN-XyL-Tail, y 6 transformantes procedentes de la transformación con el plásmido pNAH-XyL, denominados en este caso Bc-pNAH-XyL. No se obtuvo ningún transformante cuando se utilizó el plásmido pNDN-XyL en la transformación, posiblemente porque la cantidad de DNA no fuera suficiente.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES

4.1. Análisis de la capacidad para degradar xilano

Uno de los objetivos de este trabajo es valorar si el silenciamiento de los 5 genes codificantes para xilanasas de las familias GH10 y GH11, provoca totalmente la pérdida de esta actividad en el secretoma del hongo y si este hecho afecta la virulencia de *B. cinerea*. Se realizó un ensayo preliminar en las cepas transformantes obtenidas, para analizar su capacidad de degradar el xilano y utilizarlo como única fuente de carbono para su crecimiento. Para ello, se sembraron los transformantes seleccionados en placas con GamXyl, medio que contiene xilano al 1%. En cada placa se ensayaron 3 transformantes, sembrados a partir de una pequeña porción de agar con micelio, además de la cepa B0510, utilizada como control positivo (a modo de ejemplo, Fig. 5). Después de dos días de crecimiento a 20°C, se analizó el tamaño de las colonias y la degradación del xilano que los transformantes produjeron, por observación del halo que se produce en torno a las colonias, por la modificación que produce

el hongo en el medio. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias apreciables con el control positivo, ni en el tamaño de las colonias ni en el tamaño del halo producido en torno a ellas, en ninguna de las cepas ensayadas.

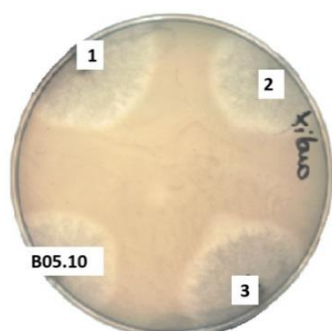


Figura 5. Ensayo de crecimiento en xilano. Placa de Petri con GamXyL, inoculada con los transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail-1, 2 y 3 después de 2 días a 20°C. Como control positivo se usó la cepa B05.10 de *B. cinerea*.

No se debe olvidar que el ensayo realizado es muy preliminar, ya que todos transformantes son heterocariontes, es decir, presentan una mezcla de núcleos transformados y silvestres. Este hecho puede influir en los resultados obtenidos, en el sentido, de que con pocos núcleos no transformados que existan en la cepa, su capacidad para degradar el xilano no se vea reducida de una forma drástica. Se necesita, por tanto, repetir el ensayo, purificando homocariontes de todos los transformantes. Purificar homocariontes es una tarea laboriosa que requiere de pases sucesivos de las cepas a medio selectivo para aislar conidias e ir eliminando en cada pase, los núcleos silvestres. En este proyecto no se pudieron aislar por falta de tiempo.

4.2. Ensayo de virulencia de las cepas Bc-pNDN-XYL-Tail y Bc-pNAH-XyL

En este apartado, se quiere valorar si el silenciamiento de los genes de las xilanasas de las familias GH10 y GH11, afectan de alguna manera la infectividad del hongo en hojas de tabaco. Para ello, se siguió el protocolo de ensayo de virulencia de *B. cinerea*. Se utilizaron las cepas Bc-pNDN-XyL-Tail, Bc-pNAH-XyL y como control la cepa B05.10 de *B. cinerea*, y en cada hoja se realizaron varias réplicas con cada una de las cepas a ensayar. Las hojas infectadas fueron mantenidas en condiciones de alta humedad a 20°C y las infecciones se siguieron a lo largo de 3 días, siendo visibles las lesiones ya desde el segundo día. El análisis de las lesiones mostró una gran variabilidad (Fig. 6), incluso entre las réplicas de una misma cepa transformante, aunque, en general, todas ellas fueron capaces de producir una lesión en la planta. No se pudo valorar si estas lesiones eran similares a las producidas por la cepa silvestre, ya que, en esta ocasión, la cepa B05.10 no produjo una lesión apreciable en ninguna de las réplicas realizadas. Se necesita, por tanto, volver a repetir el ensayo, para poder realizar una valoración más precisa de la capacidad infectiva de estos transformantes.

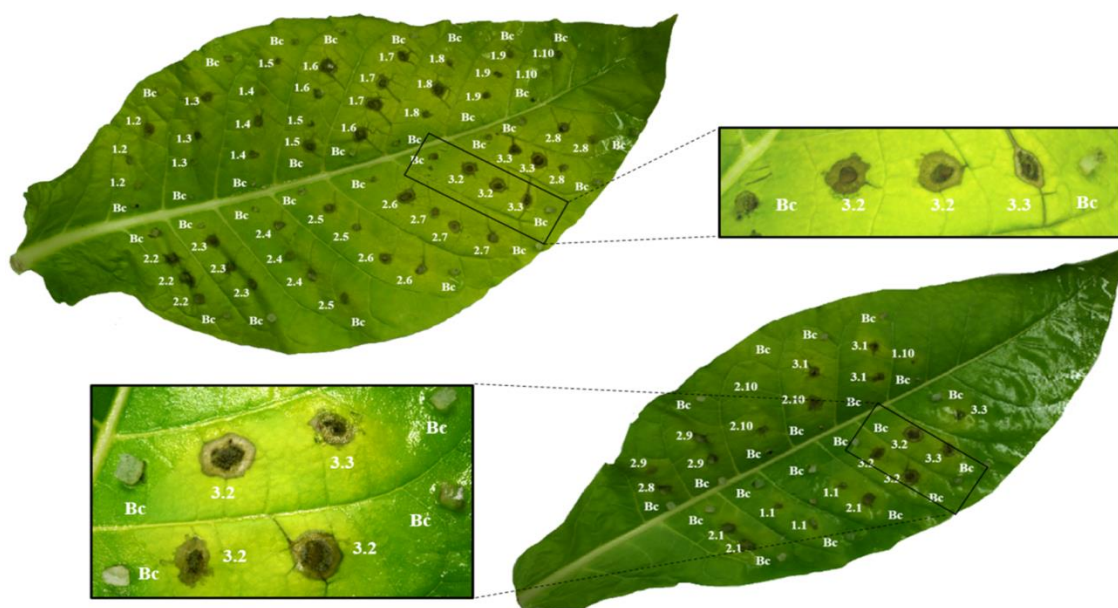


Figura 6. Ensayo de virulencia de las cepas transformantes en hojas de tabaco. Hojas de tabaco, con trozos de agar con micelio de las cepas transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail, pNAH-XyL y la cepa control de B05.10. Bc: control positivo de la cepa B05.10 de *B. cinerea*. 3.2 y 3.3, colonias de la cepa Bc-pNAH-XyL. La numeración 1 (1.1 a 1.10) y 2 (2.1 a 2.10) pertenece a la cepa Bc-pNDN-Xyl-Tail y la numeración 3 (3.1 a 3.3) pertenece a la cepa Bc-pNAH-XyL (Anexo II). En los recuadros se muestran detalles de algunas infecciones.

4.3. Análisis del DNA genómico de los transformantes.

Con el objeto de comprobar si las cepas seleccionadas contenían intacta la construcción transformante, se obtuvo DNA genómico de cada uno de los transformantes y se realizaron diferentes reacciones de amplificación.

En primer lugar, se llevó a cabo una reacción de amplificación con el fin de corroborar si los locus *niaD* o *niiA*, permanecían intactos en los genomas o, si por el contrario, se había producido su delección por la integración dirigida del DNA transformante utilizado en cada caso. Para el gen *niaD* se utilizaron los cebadores NR-MBD-BAM y NR-MBD-SMA (Tabla 1) y para la amplificación de parte del gen *niiA* se usaron los cebadores NiiA-B05-FW y NiiA-B05-RV (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran que todos los transformantes contienen los genes para *niiA* y *niaD*. (Fig. 7). Como producto de la reacción de amplificación, se espera obtener un fragmento de 501 pb para *niaD* (Fig. 7A), y uno de 616 pb para *niiA* (Fig. 7B). Sólo en uno de los transformante TAIL2.9 no se observó lo correspondiente banda amplificada. Sin embargo, tampoco se obtuvo ningún fragmento de DNA, cuando la reacción de amplificación se realizó con los cebadores NiiA-B05-FW y NiiA-B05-RV, indicando que probablemente, la calidad del DNA genómico no fue la adecuada para realizar una reacción de PCR.

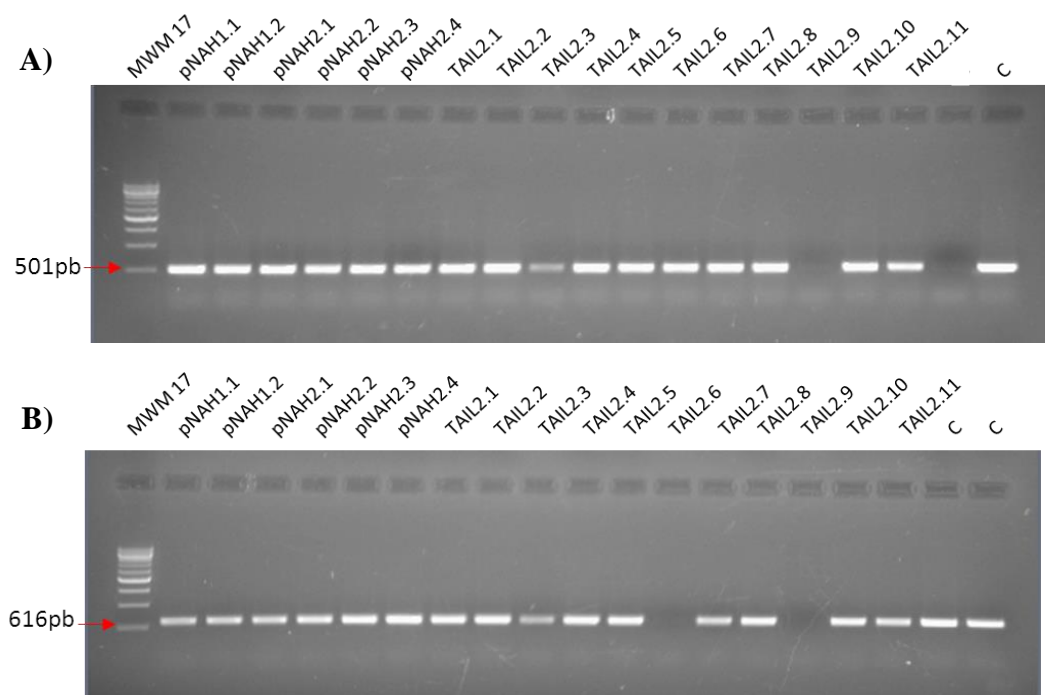


Figura 7. Electroforesis de las reacciones de PCR que amplifican los loci *niiA* y *niaD* del genoma de *B. cinerea*. Amplificaciones realizadas a partir de DNA genómico de los transformantes y de la cepa silvestre con los cebadores NR-MBD-BAM y NR-MBD-SMA (A) y NiiA-B05-FW y NiiA-B05-RV (B). pNAH., transformantes Bc-pNAH-XyL; TAIL., transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail. C, *B. cinerea* B05.10.

Estos resultados apuntan a que las cepas transformantes tienen, al menos algunos de sus núcleos, intactos, es decir, en ellos no se ha producido la integración del DNA transformante.

Debido al carácter heterocarionte de todos los transformantes en esta etapa del análisis, con esta PCR no se puede descartar que en algunos de los núcleos, sin embargo, sí se haya producido esa integración. Con el fin de poder detectar esos posibles núcleos transformados, se realizó otra reacción de amplificación, utilizando en este caso un cebador complementario a una región fuera de los fragmentos homólogos a *niaD* o *niiA* presentes en los plásmidos transformantes, NR-FW-check ó NiaA-FW-check respectivamente (Fig. 8). De esta forma, en el caso de los transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail, se realizó una PCR con los cebadores NR-FW-check y NOUR-RV-CHECK para analizar la integración dirigida en *niaD* (Fig. 8A), mientras que con los transformantes Bc-pNAH-XyL, se utilizaron los cebadores NiiA-FW-check y XYL-RV-Nco1 (Tabla 1) (Fig. 8B). En el primer caso, se espera amplificar un fragmento de 429 pb, y en el segundo, el fragmento amplificado debería ser de 2257 pb (Fig. 8A y B). Los resultados obtenidos mostraron que en ninguno de transformantes Bc-pNDN-

XyL-Tail se amplificó la banda esperada (Fig. 8C), por lo que no parece que en ninguno de ellos se ha producido la integración dirigida de la construcción silenciadora Hom_XyL en el locus *niaD*. La integración del plásmido se ha tenido que producir al azar en otra región del genoma, ya que los transformantes son resistentes a la nourseotricina, antibiótico utilizado en este caso como marcador selectivo. Sin embargo, el transformante pNAH2.1, uno de los 6 transformantes Bc-pNAH-XyL analizados, sí amplificó el fragmento de 2257 pb esperado (Fig. 8D). Si bien es cierto que la PCR realizada con los cebadores NiiA-FW-check y XYL-RV-Nco1 debe ser mejorada ya que se observaron numerosas bandas inespecíficas, la presencia de este fragmento no se produce en ninguno de los dos controles negativos incluidos en el ensayo.

En todos los casos, se requiere la purificación de cepas homocariontes para poder analizar de forma más precisa cómo se ha producido la integración del DNA transformante y asegurar que la construcción silenciadora no ha sufrido ninguna modificación en el proceso de integración en el genoma. También su aislamiento es necesario para poder caracterizar el fenotipo de los transformantes y poder analizar si el silenciamiento de las 5 xilanasas codificadas por el genoma de *B. cinerea* afecta a su patogenicidad.

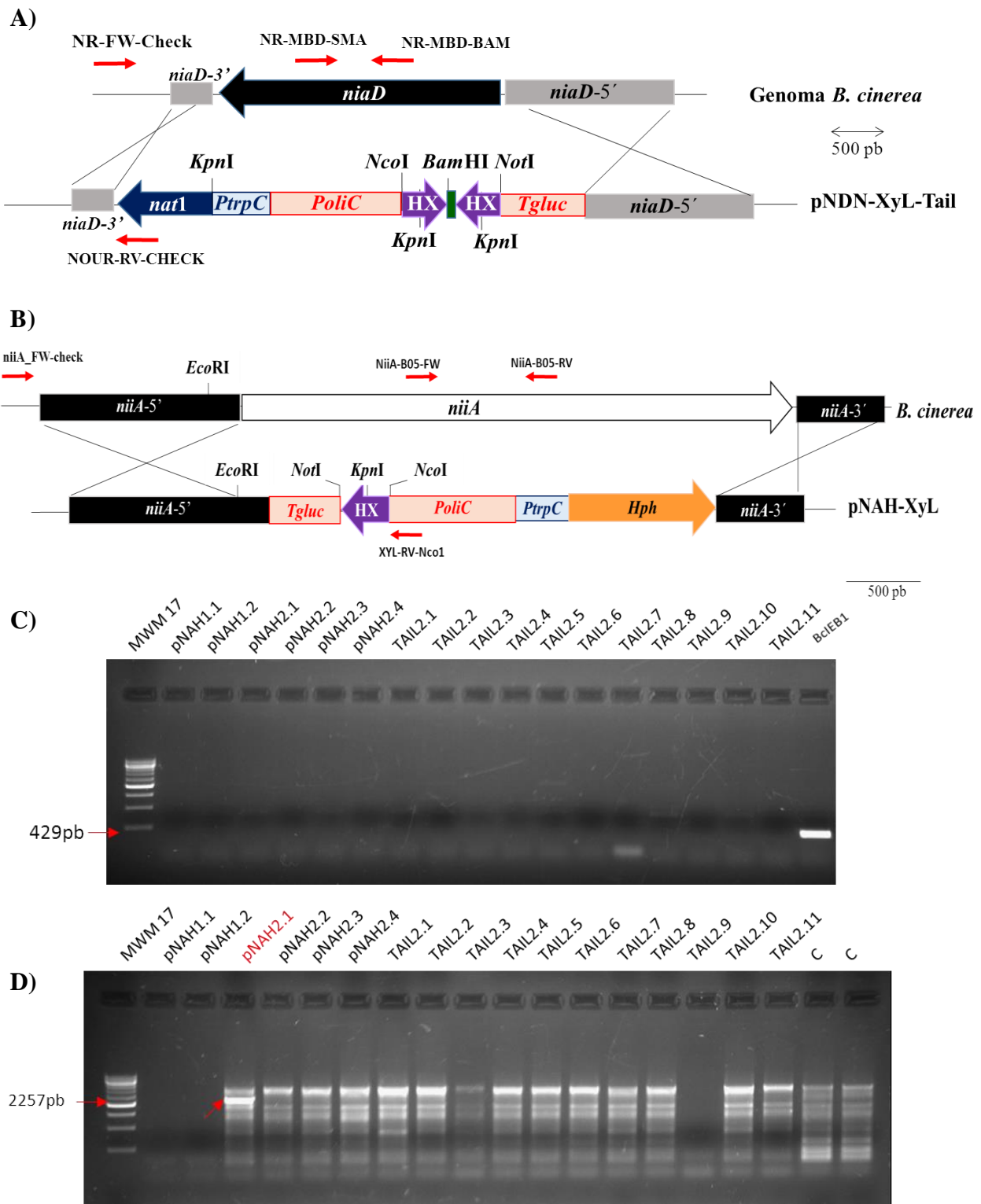
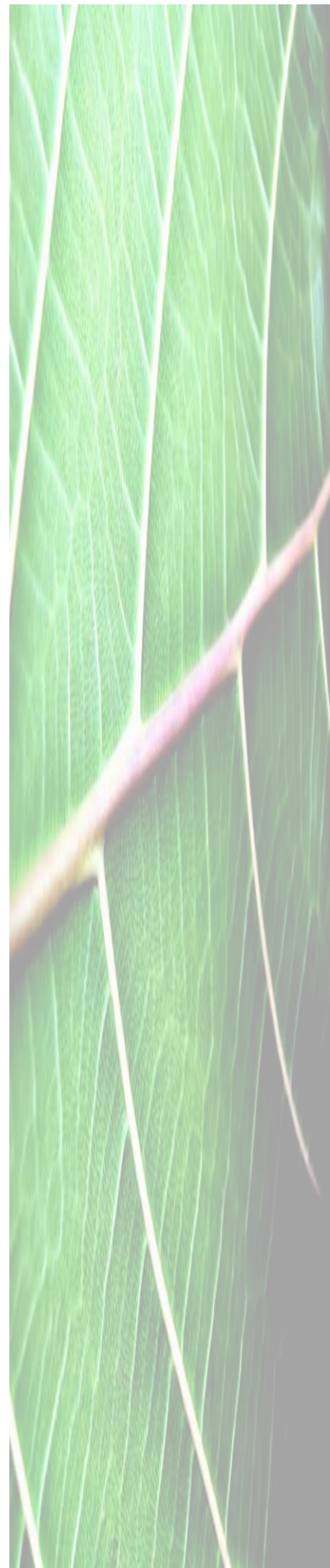


Figura 8. **A)** Esquema de la integración dirigida al locus *niaD* de *B. cinerea* del plásmido transformante pNDN-XyL-Tail. **B)** Esquema de la integración dirigida al locus *niiA* de *B. cinerea* del plásmido transformante pNAH-XyL-Tail. **C)** Electroforesis de las reacciones de amplificación a partir de DNA genómico de las cepas transformantes con los cebadores NR-FW-Check y NOUR-RV-CHECK. **D)** Electroforesis de las reacciones de amplificación a partir de DNA genómico de las cepas transformantes con los cebadores NiiA-FW-check y XYL-RV-NcoI. pNAH..., transformantes Bc-pNAH-XyL; TAIL..., transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail. C, *B. cinerea* B05.10. BcIEB1, DNA de un mutante dirigido al locus *niaD*. MW, Marcador de peso molecular XVII. Todas las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 0,7 %.

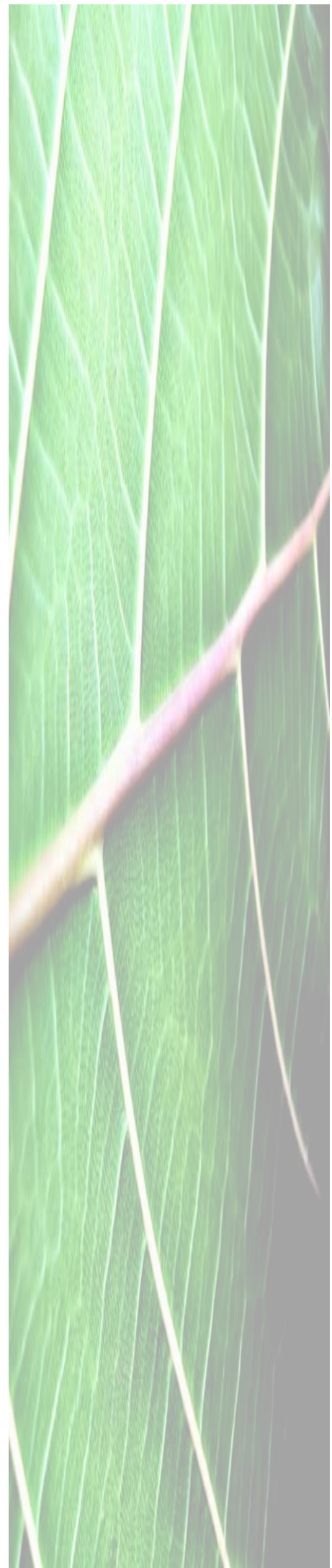
CONCLUSIONES



1. El genoma de *B. cinerea* B05.10 contiene 5 genes que codifican, presuntamente, endo- β -1,4-xilanasas. De ellas, 2 pertenecen a la familia 10 de las Glicosil Hidrolasas y 3 pertenecen a la familia 11.
2. Se ha diseñado una estrategia para el silenciamiento simultáneo de los 5 genes de endo- β -1,4-xilanasas, mediante la expresión en el hongo de una molécula de RNA de doble cadena conteniendo regiones de los 5 genes.
3. Se han generado las construcciones de DNA recombinante necesarias para el silenciamiento y se han obtenido transformantes de *B. cinerea* que las contienen, cuyo análisis permitirá determinar la eficacia del método así como estudiar el papel de las endo- β -1,4-xilanasas en el proceso infeccioso.

1. The genome of *B. cinerea* B05.10 contains 5 genes that code, putatively, for endo- β -1,4-xylanases. Two of them belong to family 10 of Glycosyl Hydrolases and three belong to family 11.
2. A strategy was developed to simultaneously silence the 5 endo- β -1,4-xylanase genes, by the expression of a double stranded RNA molecule displaying regions from the 5 genes.
3. The recombinant DNA constructs necessary for the silencing were generated, and the *B. cinerea* transformants containing them were obtained. Their analysis will allow to determine the efficacy of the methods as well as to study the role of endo- β -1,4-xylanases in the infection process.

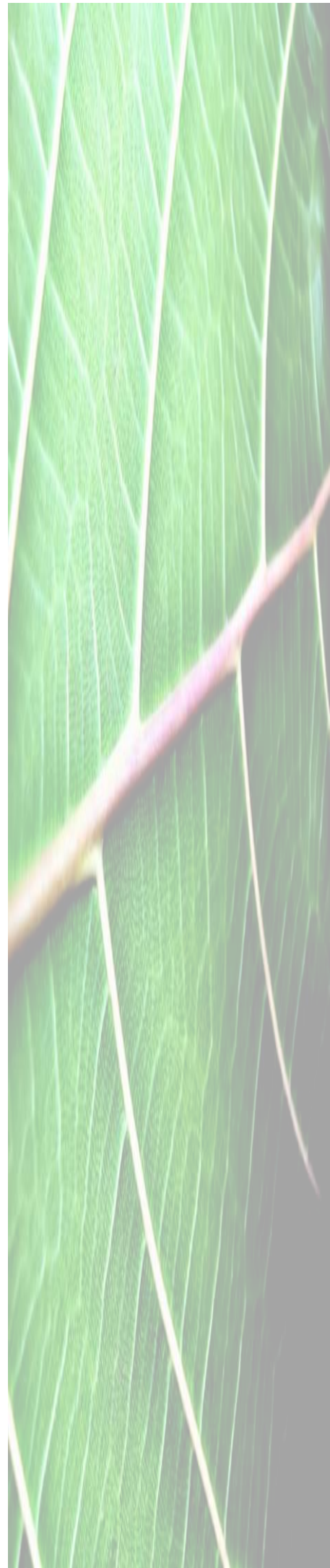
REFERENCIAS



- Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Dyer, P.S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K.M., Pradier, J.M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V.Á., Beever, R.E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E.G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., González, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B.J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rasclé, C., Schumacher, J., Séguens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D.M., Talbot, N.J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J.A., Lebrun, M.H. y Dickman, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7:e1002230.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C. y Eddy, S.R. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32:D138-D141.
- Brito, N., Espino, J.J. y González, C. 2006. The endo- β -1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:25-32.
- Burroughs, A.M., Ando, Y. y Aravind, L. 2014a. New perspectives on the diversification of the RNA interference system: insights from comparative genomics and small RNA sequencing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5:141-181.
- Burroughs, A.M., Ando, Y. y Aravind, L. 2014b. New perspectives on the diversification of the RNA interference system: insights from comparative genomics and small RNA sequencing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5:141-181.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B. y Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25:445-450.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37:D233-D238.
- Chang, S.S., Zhang, Z. y Liu, Y. 2012a. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Review of Microbiology* 66:305-323.
- Chang, S.S., Zhang, Z. y Liu, Y. 2012b. RNA Interference Pathways in Fungi: Mechanisms and Functions. *Annual Review of Microbiology* 66:305-323.
- Collins, T., Gerday, C. y Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29:3-23.
- Espino, J.J., Brito, N., Noda, J. y González, C. 2005. *Botrytis cinerea* endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 66:213-221.
- Espino, J.J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R. y González, C. 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10:3020-3034.
- Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G. y Boccara, M. 1994. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Current Genetics* 26:251-255.
- Jarvis, W.R. 1977. *Botrytinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L. y Van Kan, J.A.L. 2005. 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.
- Kuck, U. y Hoff, B. 2010. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:51-62.
- Leroux, P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.). pag. 195-222. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Melendez, H.G., Billon-Grand, G., Fevre, M. y Mey, G. 2009. Role of the *Botrytis cinerea* FKBP12 ortholog in pathogenic development and in sulfur regulation. *Fungal Genetics and Biology* 46:308-320.
- Nguyen, Q.B., Itoh, K., Van Vu, B., Tosa, Y. y Nakayashiki, H. 2011. Simultaneous silencing of endo- β -1,4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* 81:1008-1019.
- Nguyen, Q.B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S. y Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular Microbiology* 68:1348-1365.

- Noda, J., Brito, N., Espino, J.J. y González, C. 2007. Methodological improvements in the expression of foreign genes and in gene replacement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 8:811-816.
- Noda, J., Brito, N. y Gonzalez, C. 2010. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology* 10:38.
- Nunes, C.C. y Dean, R.A. 2012. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology* 13:519-529.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von, H.G. y Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786.
- Petri, S. y Meister, G. 2013. siRNA design principles and off-target effects. *Methods in Molecular Biology* 986:59-71.
- Prins, T.W., Wagemakers, L., Schouten, A. y 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.
- Pumplin, N. y Voinnet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* 11:745-760.
- Romano, N. y Macino, G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6:3343-3353.
- Rosslénbroich, H.J. y Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19:557-561.
- Rui, O. y Hahn, M. 2007. The *Botrytis cinerea* hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. *Microbiology* 153:2791-2802.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schumacher, J. 2012. Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology* 49:483-497.
- Schumacher, J. y Tudzynski, P. 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. En: Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Pérez-Martín, J. y Di Pietro, A. (eds.). pag. 225-241. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Shan, G. 2010. RNA interference as gene knockdown technique. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42:1243-1251.
- Soulie, M.C., Piffeteau, A., Choquer, M., Boccara, M. y Vidal-Cros, A. 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene *Bchs1* results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genetics and Biology* 40:38-46.
- Staats, M. y van Kan, J.A.L. 2012. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell* 11:1413-1414.
- Tafer, H. 2014. Bioinformatics of siRNA design. *Methods in Molecular Biology* 1097:477-490.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. y van Kan, J.A. 1998. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:1009-1016.
- Torres del Castillo, R. 2001. Manual del Curso de Manipulador de Productos Fitosanitarios. Nivel Básico.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. y Boccara, M. 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:360-367.
- van Kan, J.A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11:247-253.
- Van Kan, J.A.L., van't Klooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., Dees, D.C.T. y van der Vlugt-Bergmans, 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.
- Van, V.B., Itoh, K., Nguyen, Q.B., Tosa, Y. y Nakayashiki, H. 2012. Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:1135-1141.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580.
- Wilson, R.C. y Doudna, J.A. 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics* 42:217-239.
- Wubben, J., ten Have, A., van Kan, J.A. y 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.
- http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/http://www.changbioscience.com/stat/sirna.html
- (Todas las páginas web fueron consultadas en múltiples ocasiones durante el desarrollo del trabajo)

ANEXO I



1. Familia GH-10

1.1. Secuencias de los genes identificados

>BC1G_00576.1 (1594 pb)

ATGTTTTTCAGCTTTGAATCTCGCAACTTTGGCTGCCATGCTCAGTCACATAAACTTGGCTCTGGCACAGAGTCAAGGTTATGCTCAATGTAAGTTG
ACTCGGCTCAACAAAAGCACATCATGATTGACCCCTTCAGGTGGCGCAATGGCTGGGCTGGTTCTACCAGCTGTGTATCAGGATACACTTGCACA
TATTCAAAGTAAGTTTGAATCTTATATAAGAAATTTGTGAATGAAGCTAACATAGTTATAGCGCATGTATGTTAAGCTTTATAGCAAGATTTATAG
CAGTCACTCATTATTTAGATTATTCTCAGTGCCTCCCTGGATCTGCCGTTCCACAGCCACACCGACAGTAGTTACCCCGACGACCTTGAAGACC
GAGATAACAAGCCCAACCAGCACCAGTTCGGGAAGTGGTCTTAACGCCAAATTTGTTTCTCATGGAAAAGAAATATTTTGGTCTTGCCACAGATCA
AGGTCTTCTTTCATCTGGAAATAATGCGGCTGTCATCAAAGCAAACCTTTGGACAAGTGACACCAGAAAACAGCATGAAGTGGGACGCTATTGAGG
GTATAGATATTCACATAGTTCTTGAAGAGTATATGGCTGACTGGTGATAGGAACACAAAATAAATTCAACTTCGCTGGTGGCGATTATTTGGTCAA
ATGGGCGGGTGAAAATTCGCAAATTTGTCGCGGGCACACACTCTGTTTGTACACCAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA AAAATGAGAACT
GACATCAATAGGCTGGCACTCTCAACTTCCAAGCTGGGTTAGCTCTATAACCTCTGCAGCAACGCTCACTAGCGTCTTCAAAAATCACATCACTCA
AGAGATGACTCGCTGGAAGGAAAGATCTATGCATGGGTATGTCATCTTGTCTTAACTCTGCACATATAATTAACAATTATAAGGATGTCGTCAT
GAAATCTTCAACGAAGATGGTTCAATGAGATCCAGCGTGTCTACAAAAGTCTTGGCGAAAAGCTATGTTTCTATCGCCTTCAAAGCTGCTAGAGCA
GCTGACCCAAATGCAAAGCTCTACATCAATGACTACAAGTAATTCTACCCCTTTTAAAATTTTACATCCAAAGCTAACATTTCTGAAGCCTGGAT
TCAGCAACCTATCCAAAACCTTACAAACGGAATGGTTGCACACGTCAAACCTTGGATCGCTCAAGGAATCCCATTGATGGAATCGGTTTCGCAAC
CCATCTTTCAGCTGGTCAGGGAGCTGCTTCAAAGGCTGCTTGTACTGCACTTGGCGCTTCTGGTGTGAGTGAAGTTGCCGTCACAGAATTGGATAT
TGCTGGTGCAGGATCTACTGATTATGTCAACGTGAGTTAAAATTCCTGGGGAGTCCCTTTGGGATGAAGTAATATGTGATTCTAATTACTGAATAG
GTCGTCACGCATGCTTGAGCGTAAGCAAATGTGTTGGTATTACTGTCTGGGGTCTCCGTGATAACGACTCATGGCGTGAAGCTCCAGCCATTG
TTGTTTCGATGCGAACTACTCTCAAAGCCCGCATACAACGCAATCATGGCAGCATTGTAG

>BC1G_01778.1 (1584 pb)

ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTATCTTGCCCTTAGCTTACGGTCAGCTTGATACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTT
CCGCCACAGACAACGGCGAACTTACTGACACCCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCCGACAAAATCACACCTGGAAATACACAA
AAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATACCAAGGGAGATGTTGTTGTTGATTTTCGAGAGAAGAATGATCAAATTTCTGAG
ATGTCATAAATTGTGTTGGTATAATCAATTGCCGTCATGGGTTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTAATTGCGGTCTTGAAGAACCAGTT
AGTGGCCTTGTGCAGTCTTCTTAGACATTCAAATCTAATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGG
GATGTCGTCATGAGGCATTCAACGATGATGGTACCTGGAGATCATTGTGCTGTAAGTCTTTCATCATGATCCTTGTAACTTTTAAACAAAACCCAG
TATAGAACTGATCCATCCAAGTTCTATGACACCATTGGTCTCTGAATATATCCAATCGCATTGAAACCGCAGCTCTCTACGACCCAGATGTCAA
GCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACCGCTACCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCAAGCCCGCGGTATCAAAT
CGACGGTGTCCGGTCTCAAGCCCACTTCATCGTCCGGTCCACCCCAAGCAATCCGCCCTCGCTACCACCTCAAATCCTTACCAGCTCTCAATGTC
GAAGTGCCTACACCGAACTCGACGTCGGCTTCAGCTCTCTCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCCAACAAGGTGTCGACTACGCTAACACCGTC
AACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCGTATTCGTGGATCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGGT
GATGCCTGTCTCTGGTACGCTAACTATACCGTTCACCCCGCTACAACAACGTAGTTGCTGCTCTCGCCGCCGAGCAGGCACAGTCGCCCCCGTT
ACTTCTACTATTGTTTCTGCTACATCCACAGCGAAAAGTAAGTGAATCCAGTGCGGTTTCTACTAGTCCATCTGCGCCGGCCGTTTTGATCTCTAGTT
CTGTTTCCGTTTCTGCAGTTGTACCTTCTGTCTCTCAGTTGTGCAAGTTGCCAGTTCTTCTGTCTCTCTTCTGCGGCTGTTTCTCTGCTGTCTCTG
TTCCTATTTCTCATCTCTATCCCTCAAAGCAGTACACTAAAAAATGCACAAAGACCCTCTCTTCCACCACCATCACAAAAACCACCTCTACAG
CCGCAGCTTCGGGAACCTGGCGCCGAGTCGCTCTTACGGACAATGTGGCGGCGTGAAGTACAAGGGAAGTACCGTGTGTGCGCCGGCGCGGACC
TGCACCGCGCAGAATGATTACTCGCAGTGCATTCCGGCATAGT

>B0510_1817 (1584 pb)

ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTATCTTGCCCTTAGCTTACGGTCAGCTTGATACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTT
CCGCCACAGACAACGGCGAACTTACTGACACCCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCCGACAAAATCACACCTGGAAATACACAA
AAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATACCAAGGGAGATGTTGTTGTTGATTTTCGAGAGAAGAATGATCAAATTTCTGAG
ATGTCATAAATTGTGTTGGTATAATCAATTGCCGTCATGGGTTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTAATTGCGGTCTTGAAGAACCAGTT
AGTGGCCTTGTGCAGTCTTCTTAGACATTCAAATCTAATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGG
GATGTCGTCATGAGGCATTCAACGATGATGGTACCTGGAGATCATTGTGCTGTAAGTCTTTCATCATGATCCTTGTAACTTTTAAACAAAACCCAG
TATAGAACTGATCCATCCAAGTTCTATGACACCATTGGTCTCTGAATATATCCAATCGCATTGAAACCGCAGCTCTCTACGACCCAGATGTCAA
GCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACCGCTACCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCAAGCCCGCGGTATCAAAT
CGACGGTGTCCGGTCTCAAGCCCACTTCATCGTCCGGTCCACCCCAAGCAATCCGCCCTCGCTACCACCTCAAATCCTTACCAGCTCTCAATGTC

GAAGTCGCCTACACCGAACTCGACGTCCGCTTCAGCTCTCTCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCAACAAGGTGTCGACTACGCTAACACCGTC
AACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTCGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCGTATTCGTGGATCCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGGT
GATGCCTGTCTCTGGTACGCTAACTATACCGTTCACCCCGCTACAACAACGTAGTTGCTGCTCTCGCCGCCGAGCAGGCACAGTCGCCCCCGTT
ACTTCTACTATTGTTTCTGCTACATCCACAGCGAAAAGTAAGTGAATCCAGTGCGGTTTCTACTAGTCCATCTGCGCCGCCGTTTGTATCTCTAGTT
CTGTTTCCGTTTCTGCAGTTGTACCTTCTGCTCTTTCAGTTGTGCAAGTTGCCAGTCTTCTGTCTCTCTTCTGCGGCTGTTTCTCTGCTGTCTG
TTCCTATTTCCTCATCTCCTATCCCCTCAAGCAGTACACTAAAAAATGCACAAAGACCCTCTCTTCCACCACCATCACAAAAACCACCTCTACAG
CCGCAGCTTCGGGAACTGGCGCCGAGTCGCTCTTTACGGACAATGTGGCGGCGTGAACATAAGGGAAGTACCGTGTGTGCGGCCGGCGCGACC
TGCACCGCGCAGAATGATTATTACTCGCAGTGCATTCCGGCATAG

>BcT4_8157 (1584 pb)

ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTACCTTGCTTTAGCTTACGGTCAGCTTGATACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTT
CCGCCACAGACAACGGCGAACTTACTGACACTCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCCGGACAAATCACCCCTGGAAA TACACAA
AAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATACCAAGGGAGATGTTGTTGTTGATTTCCGAGAGAAGAATGATCAAATTCTGAG
ATGTCATAAATTGTTGTTGATAATCAATTGCCGTCATGGGTTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTAATTGCGGCTTTGAAGAACCAGTT
AGTAGCCTTGTGCAGTTCTTCTTAGACATTCAAATCTAATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGG
GATGTCGTCATGAGGCATTC AACGATGATGGTACCTGGAGATCAATTTGTCGTAAGTCTTCATCATGATCCTTGAACCTTCAAACAAAACCCAG
TATAGAACTGATCCATCAAGTTCTATGACACCATTGGTCTGAATATATCCCAATCGCATTGAAACCGCAGCTCTCTACGACCCAGATGTCAA
GCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACCGCTACCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCAAGCCCGCGGTATCAAAT
CGACGGTGTCCGCTCCAAGCCACTTATCGTCCGGTCCACCCAGCGAATCCGCCCTCGCCACCACCCTCAAATCCTTACCGCTCTCAATGT
CGAAGTCGCCTACACCGAACTCGACGTCCGCTTCAGCTCTCTCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCAACAAGGTGTCGACTACGCTAACACCGT
CAACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTCGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCGTATTCGTGGATCCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGG
TGATGCCTGTCTCTGGTACGCTAACTATACCGTTACCCCGCCTACAACAACGTAGTTGCTGCTCTCGCCGCCGAGCAGGCACAGTCGCCCCCGT
TACTTCTACTATTGTTTCTGCTACATCCACAGCGAAAGTAAGTGAATCCAGTGCGGTTTCTACTAGTCCATCTGCGCCGCCGTTTGTATCTCTAGT
CCTGTTTCCGTTTCTGCAGTTGTACCTTCTGTCTCTTCAGTTGTGCAAGTTGCCAGTCTTCTGTCTCTCTTCTGCGGCTGTTTCTCTGCTGTCTCT
GTTCTATTTCTCATCTCCTATCCCCTCAAGCAGTACACTAAAAAATGCACAAAGACCCTCTCTTCCACCACCATCACAAAAACCACCTCTACA
GCCGCAGCTTCGGGAACTGGCGCCGAGTCGCTCTTTACGGACAATGTGGCGGCGTGAACATAAGGGAAGTACCGTGTGTGCGGCCGGCGCGCAGC
CTGCACCGCGCAGAATGATTATTACTCGCAGTGCATTCCGGCATAG

1.2. Alineamientos entre los genes identificados

BC1G_01778.1/B0510_1817/BcT4_8157 (porcentaje de identidad: 100%)

B0510_1817	ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTATCTTGCTTTAGCTTACGGTCAGCTTGAT	60
BC1G_01778	ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTATCTTGCTTTAGCTTACGGTCAGCTTGAT	60
BcT4_8157	ATGCATATATCAAATCTTATAACTCTTGCTACCTTGCTTTAGCTTACGGTCAGCTTGAT	60

B0510_1817	ACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTTCCGCCACAGACAACGGCGAACTT	120
BC1G_01778	ACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTTCCGCCACAGACAACGGCGAACTT	120
BcT4_8157	ACGCTTGCCAAGGCTGCTGGCCTCAAATACTTTGGTTCCGCCACAGACAACGGCGAACTT	120

B0510_1817	ACTGACACCCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCGGACAAATCACACCT	180
BC1G_01778	ACTGACACCCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCGGACAAATCACACCT	180
BcT4_8157	ACTGACACTCAATACACCGCTATCTTGTCAAACAACAGTCAGTTCGGACAAATCACCCCT	180

B0510_1817	GGAAATACACAAAAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATAACCAAG	240
BC1G_01778	GGAAATACACAAAAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATAACCAAG	240
BcT4_8157	GGAAATACACAAAAATGGCAATACATAGAACCCACCCAAAACACATTCAGCTATAACCAAG	240

B0510_1817	GGAGATGTTGTTGTTGATTTTCGCAGAGAAGAATGATCAAATTCTGAGATGTCATAACTTG	300
BC1G_01778	GGAGATGTTGTTGTTGATTTTCGCAGAGAAGAATGATCAAATTCTGAGATGTCATAACTTG	300
BcT4_8157	GGAGATGTTGTTGTTGATTTTCGCAGAGAAGAATGATCAAATTCTGAGATGTCATAACTTG	300

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

B0510_1817	TGTTGGTATAATCAATTGCCGTCATGGGTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTA	360
BC1G_01778	TGTTGGTATAATCAATTGCCGTCATGGGTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTA	360
BcT4_8157	TGTTGGTATAATCAATTGCCGTCATGGGTACTTCGGGCACATGGACGAATGAGACTTTA *****	360
B0510_1817	ATTGCGGTCCTTGAAGAACCAGTTAGTGGCCTTGTGCAGTTCTTCTTAGACATTCAAATCT	420
BC1G_01778	ATTGCGGTCCTTGAAGAACCAGTTAGTGGCCTTGTGCAGTTCTTCTTAGACATTCAAATCT	420
BcT4_8157	ATTGCGGTCCTTGAAGAACCAGTTAGTAGCCTTGTGCAGTTCTTCTTAGACATTCAAATCT *****	420
B0510_1817	AATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGGG	480
BC1G_01778	AATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGGG	480
BcT4_8157	AATCATATCGCAGCATTAAAAATGAGGTAACCTTACTACAAGGGCAAATGCTACGCCTGGG *****	480
B0510_1817	ATGTCGTCAATGAGGCATTCAACGATGATGGTACCTGGAGATCATTTGTCGTAAGTCTTC	540
BC1G_01778	ATGTCGTCAATGAGGCATTCAACGATGATGGTACCTGGAGATCATTTGTCGTAAGTCTTC	540
BcT4_8157	ATGTCGTCAATGAGGCATTCAACGATGATGGTACCTGGAGATCATTTGTCGTAAGTCTTC *****	540
B0510_1817	ATCATGATCCTTGTAACCTTTTAAACAAAACCCAGTATAGAACTGATCCATCCAAGTTC	600
BC1G_01778	ATCATGATCCTTGTAACCTTTTAAACAAAACCCAGTATAGAACTGATCCATCCAAGTTC	600
BcT4_8157	ATCATGATCCTTGTAACCTTTCAAACAAAACCCAGTATAGAACTGATCCATCCAAGTTC *****	600
B0510_1817	TATGACACCATTTGGTCCTGAATATATCCCAATCGCATTCGAAACCGCAGCTCTCTACGAC	660
BC1G_01778	TATGACACCATTTGGTCCTGAATATATCCCAATCGCATTCGAAACCGCAGCTCTCTACGAC	660
BcT4_8157	TATGACACCATTTGGTCCTGAATATATCCCAATCGCATTCGAAACCGCAGCTCTCTACGAC *****	660
B0510_1817	CCAGATGTCAAGCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACC	720
BC1G_01778	CCAGATGTCAAGCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACC	720
BcT4_8157	CCAGATGTCAAGCTCTACTACAACGATTACAACATCGAGTCTTCCGGTGCAAAGGCAACC *****	720
B0510_1817	GCTACCCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCCAAGCCC GCGGTATCAAATCGACGGTGTCCGGT	780
BC1G_01778	GCTACCCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCCAAGCCC GCGGTATCAAATCGACGGTGTCCGGT	780
BcT4_8157	GCTACCCCTCAACCTCGTTAAGTCTCTCCAAGCCC GCGGTATCAAATCGACGGTGTCCGGT *****	780
B0510_1817	CTCCAAGCCCACCTTCATCGTCGGCTCCACCCCCAGCGAATCCGCCCTCGCTACCACCCTC	840
BC1G_01778	CTCCAAGCCCACCTTCATCGTCGGCTCCACCCCCAGCGAATCCGCCCTCGCTACCACCCTC	840
BcT4_8157	CTCCAAGCCCACCTTCATCGTCGGCTCCACCCCCAGCGAATCCGCCCTCGCCACCACCCTC *****	840
B0510_1817	AAATCCTTCACCGCTCTCAATGTGCAAGTCGCCTACACCGAACTCGACGTCCGCTTCAGC	900
BC1G_01778	AAATCCTTCACCGCTCTCAATGTGCAAGTCGCCTACACCGAACTCGACGTCCGCTTCAGC	900
BcT4_8157	AAATCCTTCACCGCTCTCAATGTGCAAGTCGCCTACACCGAACTCGACGTCCGCTTCAGC *****	900
B0510_1817	TCTCTCCCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCCAACAAGGTGTGCGACTACGCTAACACCGTC	960
BC1G_01778	TCTCTCCCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCCAACAAGGTGTGCGACTACGCTAACACCGTC	960
BcT4_8157	TCTCTCCCCCCCACCACCGCCGGGCTCGCCCAACAAGGTGTGCGACTACGCTAACACCGTC *****	960
B0510_1817	AACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTCGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCG	1020
BC1G_01778	AACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTCGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCG	1020
BcT4_8157	AACGCCTGTCTCAGCGTCGACGGCTGCGTCGGTATCACCATCTGGGACTTCACAGATGCG *****	1020
B0510_1817	TATTCGTGGATCCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGGTGATGCCTGTCTCTGGTACGCTAAC	1080
BC1G_01778	TATTCGTGGATCCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGGTGATGCCTGTCTCTGGTACGCTAAC	1080
BcT4_8157	TATTCGTGGATCCCATCGACCTTCTCTGGCCAAGGTGATGCCTGTCTCTGGTACGCTAAC *****	1080

BC1G_00576.1	CAAGTAATTCTACCCTTTTTAAA-----ATT--TTACATCCAAAGC-TAACATTTCTCTG	1141
BC1G_01778.1	CAGGTA---CCATCATCGTTGAATGCCTCATTGACGACATCCCAGGCGTAGCATTGACC- ** ** * * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * *	1123
BC1G_00576.1	AAGCCTGGATTTCAGCAACCT-ATCCCAAAC-TTACAAACGGAATGGTTGCACACGTCAAA	1199
BC1G_01778.1	---CTTGTAGTAAGTTACCTCATTTTTAATGCTGCGATATGATTAGATTTGAATGTCTAA *	1180
BC1G_00576.1	ACTTGGATCGCTCAAGGAATTCCCATTGATGGAATC----GGTTCGCAAACCCATCTTTC	1255
BC1G_01778.1	GAA-GAACTGCACAAGG-----CCACTAACTGGTTCTTCAAGACCGCAA-TTAAAGTCTC *	1233
BC1G_00576.1	AGCTGGTCAGGGAGCTGCTTCAAAGGCTGCTTTGACTGCACCTTGCCGCTTCTGGTGTCTAG	1315
BC1G_01778.1	ATTCGTCCATG----TGCC-CGAAGTAACCCATGACGGCAATTGATTATACCAACACAAG *	1288
BC1G_00576.1	TGAAGTTGCCGTCACAGAATTGGAT-ATTGCTGG-TGCAGGATCTACTGATTATGTCAAC	1373
BC1G_01778.1	TTA---TGACATCTCAGAATTTGATCATTCTTCTCTGCGAAATCAAC-AACAACATCTCC *	1344
BC1G_00576.1	GTGAGTTTA----AAT---TCCTGGGGAGTCCCTTTGGGATGA-AGTAATATGTGATTCT	1425
BC1G_01778.1	CTTGGTATAGCTGAATGTGTTTTGGGTGGGTTCTATGTATTGCCATTTTTGTGTATTTC *	1404
BC1G_00576.1	AATTACTGAATAGGTCG--TCAACGCATGCTTGAGCGTA-AGCAAATGTGTTGG-TATTA	1481
BC1G_01778.1	AGGTG-TGATTTGTCCGAAGTACTGTTGTTTGACAAGATAGCGG-TGTATTGGGTGTCA *	1462
BC1G_00576.1	CT--GTCTGGGGTC-TCCGTGATAACGACTCATGGCGTGCAAGCTC--CAGCCCATTGTT	1536
BC1G_01778.1	GTAAGTTCGCCGTTGTCTGTGGCG--GAACCAAAGTATTTGAGGCCAGCAGCC--TTGGC *	1518
BC1G_00576.1	GTTCGATGCGAACT-ACTCT---CCAAAGCCCGCATACAACGCAATCATGGCA----GCA	1588
BC1G_01778.1	AAGCGTATCAAGCTGACCGTAAGCTAAAGGCAAGATAGCAAG-AGTTATAAGATTTGATA *	1577
BC1G_00576.1	T-TGTAG	1594
BC1G_01778.1	TATGCAT * * * *	1584

1.3. Análisis de los genes BC1G_00576.1 y BC1G_01778.1, proteínas que codifican y diseño de siRNAs

En las secuencias de los genes, se señalan en minúsculas los posibles intrones y en rojo y subrayado la región elegida para formar parte de la construcción silenciadora.

En las secuencias de las proteínas se señala la secuencia señal en rojo.

>BC1G_00576.1

ATGTTTTTCAGCTTTGAATCTCGCAACTTTGGCTGCCATGCTCAGTCACATAAACTTGGCTCTGGCACAGAGTCAAGGTTATGCTCA
ATgtaagtgtactcgctcaacaaagcacatcatgattgacctttcaggtggcggcaatggctgggctggttaccagctgtgtatcaggatatacactgacatattcaaagtaagttgaatcttataagaat
tgtgaatgaagctaacatagttatagcgcattgtgtaagctttatgcaagattatagcagtcactcattttattagATTATTCTCAGTGCCTCCCTGGATCTGCCGTTCCACAG
CCACACCGACAGTAGTTACCCCGACGACCTTGAAGACCGAGATAACAAGCCCAACCAGCACCAGTCCGGAAGTGGTCTTAACG
CCAAATTTGTTTCTCATGGAAAGAAATATTTTGGTCTTGCCACAGATCAAGGTCTTCTTTCATCTGGAAATAAT**GCGGCTGTCA**
CAAAGCAAACCTTTGGACAAGTGACACCAGAAAAACAGCATGAAGTGGGACGCTATTGAGGgtatagatattcacatagttctgaagagtatatgctga

ALYDPDVKLYYNDYNISSGAKATATLNLVKSLQARGIKIDGVLQAHFIVGSTPSESALATTLKSFTALNVEVAYTELDVRFSSLPPTT
 AGLAQQGVVDYANTVNACLSVDGCVGITIWDFTDAYSWIPSTFSGQGDACLWYANYTVHPAYNNVVAALAAAAGTVAPVTSTIVSAT
 STAKVSESSAVSTSPSAPAVLISSSVSVSAVPSVSSVVQVASSSVLSSAAVSSAVSVPISSSPISSSTLKKCTKLSSTTITKTTSTAAASG
 TGAVALYGQCGGVNYKGSTVCAAGATCTAQNDYYSQCIPA

1.4. Alineamiento de las proteínas codificadas por BC1G_00576.1 y BC1G_01778.1

Identidad: 152/539 (28.2%). Similitud: 194/539 (36.0%)

```

BC1G_00576.1      MFSALNLATLAAMLSHINLALAQSQGYAQYYSQCLPGSAVPTATPTVVTPTTLKTEITSP 60
BC1G_01778.1      -MHISNLITLAILP-----LAYGQ----- 18
                   :   **   ***   :           **   .*

BC1G_00576.1      TSTSSGSLNAKFVSHGKKYFGLATDQGLLSSGNNAAVIKAN--FGQVTPENSMKWDAIE 118
BC1G_01778.1      -----LDTLAKAAGLKYFGSATDNGELTDTQYTAILSNNSQFGQITPGNTQKWQYIE 70
                   *: :   : *   ****   ***:* * :. : :*: :. *   ***:* * : * : *

BC1G_00576.1      GTQNKFNFAGGDYLVKWAG-----WHSQLPSWVSS-ITSAATLTSVLQNHITQ 165
BC1G_01778.1      PTQNTFSYTKGDVVVDFAEKNDQILRCHNLCWYNQLPSWVTSGTWTNETLIAVLKNHIKN 130
                   ***.*.: : *   :*.:*           *.:*****:*   :   **   :*:***.:

BC1G_00576.1      EMTRWKGKIYAWDVVNEIFNEDGSMRSSFVYKVLGESYVSIAFKAARAADPNAKLYINDY 225
BC1G_01778.1      EVTYKYGKCYAWDVVNEAFNDDGTWRSFVFDYDTIGPEYIPIAFETAALYDPDVKLYYNDY 190
                   *:*   :***   *****   **:* : *   ***.:*   *.:***:*   **.:***   ***

BC1G_00576.1      NLDSATYPKLTNGMVAHVKTWIAQGIPIIDGIGSQTHLSAGQGAASKAALATALAASGVS-- 283
BC1G_01778.1      NIESS--GAKATATLNLVKSLQARGIKIDGVLQAHFIVGSTPSESALATTLKSFTALNV 248
                   *:*:*   :.. :   ** :   *:* **:* * :*:   .*   .....*   *:*   :

BC1G_00576.1      EVAVTELDI-----AGAGST--DYVNVVNACLSVSKCVGITVWGLRDNDNWRASSS 332
BC1G_01778.1      EVAYTELDVRFSSLPPTTAGLAQQGVVDYANTVNACLSVDGCVGITIWDFTDAYSWIPSTF 308
                   ***   ****:           **   ..   **.*.*****.   *****:*.: *   **   .*:

BC1G_00576.1      P-----LLFDANYSKPAYNAIMAAL----- 353
BC1G_01778.1      SGQGDACLWYANYTVHPAYNNVVAALAAAAGTVAPVTSTIVSATSTAKVSESSAVSTSPS 368
                   .           * :   *** :   :****   ::*

BC1G_00576.1      -----
BC1G_01778.1      APAVLISSSVSVSAVPSVSSVVQVASSSVLSSAAVSSAVSVPISSSPISSSTLKKCTK 428

BC1G_00576.1      -----
BC1G_01778.1      TLSSTTITKTTSTAAASGTGAVALYGQCGGVNYKGSTVCAAGATCTAQNDYYSQCIPA 487
    
```

2. Familia GH-11

2.1. Secuencias de los genes identificados

>BC1G_13645.1 (738 pb)

ATGATTACCTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATTCCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATT
 TTGTTCTCCAACGCAACGAAAGCTCTCTGTTTCGTGCAACTCCAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTAATCTACACACCAT
 CCGGCAGCTCTTCACTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTGTCTGGTCTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCCTCACA
 CTCCTAATGAAAAGATTCATGAAATGAAAAGTGAATACTTAACATACAGTCTATAAACTTCAGCGGCACCTTCGGCATCGGATCCGGCACC
 GCCCTCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCACTCGTAGAATACTACATCGTCAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAA
 GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATACCATTTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAACCTTCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACAGTA

CATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGGAAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAATTTGGGAACGC
TTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGGGTGGGGTGGTGAGGGGGCTGCTACGCAGACGGTTAGTTAG

>BC1G_03590.1 (1170 pb)

ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGTCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATATCCAGCCAACTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTG
GGACACCTAGCTCTACTGGAACCAAGTGGTTTGTATCCATATTCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCCTGATTAGGTGGATACTACTATTC
CTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCTGGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTGGTG
GAAAGGGCTGGAATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTAAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATTATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAA
TTACCTGTAGGGCTGTACCTATAGTGGCACGTACAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGAATA
CTATGTTGTCGAGAACCTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGGTACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAGTCAAACCTT
CTGTCACTTCTATATTCTCCAAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGGCAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAACTACCCAGCGACTGATG
GAATAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCAACGCGTCAATCAACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTCGACAG
ACAAAGCGAACTGGTGGTACCGTAACGACCCGAAATCATTTAATGCTTGGAAAGCACTAGGAATGAACATGGGTACATTCGATTACATGATAGT
CGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGATAGTGGAAAGTCTACCTCGGCTCCAC
TACTTCTCTACAACATCACCAAGGTGGCACCGTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTCTAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTT
AGTGCGGTGCTCTATACAGCCAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTATGCAAATCTTACTATT
CTCAATGCTTGTGA

>B0510_640 (750 pb)

ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCGCCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAAGTGAATGTCT
TGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCTTCCGCTACCGGTACTAGTGGTGGTACTACTACTCCTTCTGGACCGATGGAAGCGGTGGTGTACATACTCCA
ACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGTAACAAGGGTAACTTCGTCGGTGGAAAAGGATGGGCTGTGGTTCCGAGCGGTAAGTT
TTTTTTTTCTTCCCTTCGTCATACATGAAAAGACATCAAACCTAATTTCTCCGCAAAGCTCCATCTCTACACCGGATCCTACAAAACCAACGGAA
ACTCTACCTCTCCGCTCTATGGTTGGACTACCTCCCCCTCATCGAATACTACATCGTCAAGACTTTGGCACCTACGATCCCTCCTCCGCCGCCAC
CGAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTTCACATACAAGATCCTCGAGACCACCGTACAAACCAACCTTCCGTTCAAGGAACTGCTACCTTCA
AGCAATACTGGTCCGTCCTACTAGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCAACACTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTGGGATTGACTTTG
GGCTCAACTTAAACTACCAAATGTTGCTGTTGAGGGTTACCAAAGCAGTGGTTCGGCTCCATCACTGTTTCTTAA

>B0510_3175 (1170 pb)

ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGTCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATATCCAGCCAACTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTG
GGACACCTAGCTCTACTGGAACCAAGTGGTTTGTATCCATATTCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCCTGATTAGGTGGATACTACTATTC
CTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCTGGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTGGTG
GAAAGGGCTGGAATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTAAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATTATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAA
TTACCTGTAGGGCTGTACCTATAGTGGCACGTACAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGAATA
CTATGTTGTCGAGAACCTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGGTACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAGTCAAACCTT
CTGTCACTTCTATATTCTCCAAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGGCAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAACTACCCAGCGACTGATG
GAATAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCAACGCGTCAATCAACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTCGACAG
ACAAAGCGAACTGGTGGTACCGTAACGACCCGAAATCATTTAATGCTTGGAAAGCACTAGGAATGAACATGGGTACATTCGATTACATGATAGT
CGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGATAGTGGAAAGTCTACCTCGGCTCCAC
TACTTCTCTACAACATCACCAAGGTGGCACCGTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTCTAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTT
AGTGCGGTGCTCTATACAGCCAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTATGCAAATCTTACTATT
CTCAATGCTTGTGA

>B0510_2491 (738 pb)

ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATTCCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATT
TTGTTCTCCAACGCAACGAAAAGCTCTTGTTCGTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTAATCTACACACCAT
CCGGCAGCTCTTTCAGTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTCTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCTCACA
CTCACTAATGAAAAGATTATGAAATGAAAAGTATAATACTTAACTAACATACAGTCTATAAACTTCAGCGGCACTTTCGGCATCGGATCCGGCACC
GCCCTCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCACTCGTAGAATACTACATCGTCAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAA
GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATACCATTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAACCTTCCATTGTAGGAACCGGACTTTTAAACAGTA
CATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGGAAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAATTTGGGAACGC
TTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGGGTGGGGTGGTGAGGGGGCTGCTACGCAGACGGTTAGTTAG

>BcT4_797 (750 pb)

ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCGCCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAAGCTGAATGTCT
 TGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCTTCCGCTACCGGTACTAGTGGTGGTACTACTACTCTTCTGGACCGATGGAAGCGGTGGTGTACATACTCCA
 ACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTAACAAGGGTAACTTCGTCGGTGGAAAAGGATGGGCTGTGGTTCCGAGCGGTAAGTT
 TTTTTTCTTCCCTTCGTCATACATGAAAAGACATCAAATAATTTCTCCCGCAAAGCTCCATCTCCTACACCGGATCCTACAAACCAACGGAAA
 CTCCTACCTCTCCGCTATGGTTGGACTACCTCCCCCTCATCGAATACTACATCGTCGAAGACTTTGGCACCTACGATCCCTCCTCCGCGCCACC
 GAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTCCACATACAAGATCCTCGAGACCACCCGTACAAACCAACCTTCCGTTCAAGGAACTGCTACCTCAA
 GCAATACTGGTCCGTCCTACTAGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTACCCTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTGGGATTGACTTTGG
 GCTCAACCTACAACCTACCAAATTGTTGCTGTTGAGGGTTACCAAAGCAGTGGTTCCGCTTCCATCACTGTTTCTTAA

>BcT4_9475 (1170 pb)

ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTACGAGAGTCTTAACATATCCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTG
 GGACACCTAGTCTACTGGAACCAAGTGGTTGTATCCATATTCCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCTGATTAGGTGGATACTACTATTC
 CTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGTGGTGGCGAGTACAAACTTCAATGTCAGGAAATGGCAATCTTGTGGTG
 GAAAGGGCTGGAATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTAAAAAGTTCTTTGATCTTATCATGACTAAGATTATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAA
 TTACCTGTAGGGCTGTACCTATAGTGGCACGTACAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGAATA
 CTATGTTGTCGAGAAGTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAGGTACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAAGTCAAACCT
 CTGTCACTTCTATATTTCTCCAAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGGGAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAACTACCCAGCGACTGATG
 GAATAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCAACGCGTCAATCAACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTCGACAG
 ACAAAGCGAACTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTAATGCTTGGAAAGCACTAGGAATGAACATGGGTACATTCGATTACATGATAGT
 CGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGATAGTGAAGTCTACCTCGGCTCCAC
 TACTTCTCTACAACATCACCAGGTGGCACCGTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTCTAGATTGCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTT
 AGTGCGGTGCTCTATACAGCCAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTATGCAAATTTACTATT
 CTCAATGCTTGTGA

>BcT4_5561 (738 pb)

ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATTCCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATT
 TTGTTCTCCAACGCAACGAAAGCTCTTGTTCGTCGTCGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTAATCTACACACCAT
 CCGGCAGCTCTTTCAGTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTCTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCCTCACA
 CTCACTAATGAAAAGATTATGAAATGAAAAGTATAATACTTAACATACAGTCTATAAACTTCAGCGCCTTTCGGCATCGGATCCGGCACC
 GCCCTCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCACTCGTAGAATACTACATCGTCGAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAA
 GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATACCATTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAACCTTCATTGTAGGAACCGGACTTTTAAACAGTA
 CATCTCGGTGCGATCTCCCCGCGAAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAATTTGGGAACGC
 TTAATTACCAGTTTTTGGCGGTGGAGGGTGGGGTGGTGGAGGGGCTGCTACGCAGACGGTTAGTTAG

2.2. Alineamientos entre los genes identificados

BC1G_13645.1/ B0510_2491/BcT4_5561 (porcentaje de identidad: 100%)

BC1G_13645	ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATT	60
B0510_2491	ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATT	60
BcT4_5561	ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATT	60

BC1G_13645	CCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATTTTGTCTCCAACGCAACGAAAGC	120
B0510_2491	CCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATTTTGTCTCCAACGCAACGAAAGC	120
BcT4_5561	CCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGCCCAATGAATTTTGTCTCCAACGCAACGAAAGC	120

BC1G_13645	TCTCTTGTTCGTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTA	180
B0510_2491	TCTCTTGTTCGTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTA	180
BcT4_5561	TCTCTTGTTCGTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTGGAGATGTA	180

BC1G_13645	ATCTACACACCATCCGGCAGCTCTTTCAGTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTGTC	240
B0510_2491	ATCTACACACCATCCGGCAGCTCTTTCAGTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTGTC	240
BcT4_5561	ATCTACACACCATCCGGCAGCTCTTTCAGTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTGTC	240

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de B. cinerea

BC1G_13645 GTTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCCCTCACACTCACTAATGA 300
 B0510_2491 GTTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCCCTCACACTCACTAATGA 300
 BcT4_5561 GTTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTCCCTCACACTCACTAATGA 300

BC1G_13645 AAAGATTCATGAAATGAAAACCTGATAATACTTAACATACAGTCCTATAAACTTCAGCGGC 360
 B0510_2491 AAAGATTCATGAAATGAAAACCTGATAATACTTAACATACAGTCCTATAAACTTCAGCGGC 360
 BcT4_5561 AAAGATTCATGAAATGAAAACCTGATAATACTTAACATACAGTCCTATAAACTTCAGCGGC 360

BC1G_13645 ACTTTCGGCATCGGATCCGGCACCGCCCTCCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCA 420
 B0510_2491 ACTTTCGGCATCGGATCCGGCACCGCCCTCCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCA 420
 BcT4_5561 ACTTTCGGCATCGGATCCGGCACCGCCCTCCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCA 420

BC1G_13645 CTCGTAGAATACTACATCGTCTGAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAAA 480
 B0510_2491 CTCGTAGAATACTACATCGTCTGAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAAA 480
 BcT4_5561 CTCGTAGAATACTACATCGTCTGAAGACAGCGCATCTCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAAA 480

BC1G_13645 GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATAACCATTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAA 540
 B0510_2491 GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATAACCATTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAA 540
 BcT4_5561 GGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATAACCATTGGGAAAATCAACGTGTGAATGAA 540

BC1G_13645 CCTTCCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACCAGTACATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGG 600
 B0510_2491 CCTTCCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACCAGTACATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGG 600
 BcT4_5561 CCTTCCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACCAGTACATCTCGGTGCGATCTTCCCCGCGG 600

BC1G_13645 AAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAAT 660
 B0510_2491 AAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAAT 660
 BcT4_5561 AAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAAT 660

BC1G_13645 TTGGGAACGCTTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGGGGTGGGGTGGTGGAGGGGGCTGCT 720
 B0510_2491 TTGGGAACGCTTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGGGGTGGGGTGGTGGAGGGGGCTGCT 720
 BcT4_5561 TTGGGAACGCTTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGGGGTGGGGTGGTGGAGGGGGCTGCT 720

BC1G_13645 ACGCAGACGGTTAGTTAG 738
 B0510_2491 ACGCAGACGGTTAGTTAG 738
 BcT4_5561 ACGCAGACGGTTAGTTAG 738

BC1G_03590.1/ B0510_3175/BcT4_9475 (porcentaje de identidad: 100%)

B0510_3175 ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATAT 60
 BcT4_9475 ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATAT 60
 BC1G_03590 ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATAT 60

B0510_3175 CCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAACC 120
 BcT4_9475 CCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAACC 120
 BC1G_03590 CCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGTCGATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAACC 120

B0510_3175 AGTGGTTTTGTATCCATATCCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCCTGATTAGGT 180
 BcT4_9475 AGTGGTTTTGTATCCATATCCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCCTGATTAGGT 180

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

BC1G_03590	AGTGGTTTGTATCCATATCCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCCTGATTAGGT	180

B0510_3175	GGATACTACTATTCCTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCT	240
BcT4_9475	GGATACTACTATTCCTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCT	240
BC1G_03590	GGATACTACTATTCCTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCT	240

B0510_3175	GGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTTGGTGGAAAGGGCTGG	300
BcT4_9475	GGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTTGGTGGAAAGGGCTGG	300
BC1G_03590	GGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTTGGTGGAAAGGGCTGG	300

B0510_3175	AATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTTAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATT	360
BcT4_9475	AATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTTAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATT	360
BC1G_03590	AATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTTAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATT	360

B0510_3175	ATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAATTACCTGTAGGGCTGTTACCTATAGTGGCACGTA	420
BcT4_9475	ATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAATTACCTGTAGGGCTGTTACCTATAGTGGCACGTA	420
BC1G_03590	ATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAATTACCTGTAGGGCTGTTACCTATAGTGGCACGTA	420

B0510_3175	CAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGA	480
BcT4_9475	CAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGA	480
BC1G_03590	CAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGA	480

B0510_3175	ATACTATGTTGTCGAGAACTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGG	540
BcT4_9475	ATACTATGTTGTCGAGAACTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGG	540
BC1G_03590	ATACTATGTTGTCGAGAACTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGG	540

B0510_3175	TACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAGTCAAACCTTCTGTCACTTCTATATTCTCCC	600
BcT4_9475	TACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAGTCAAACCTTCTGTCACTTCTATATTCTCCC	600
BC1G_03590	TACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAGTCAAACCTTCTGTCACTTCTATATTCTCCC	600

B0510_3175	AAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGCGAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAAC	660
BcT4_9475	AAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGCGAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAAC	660
BC1G_03590	AAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGCGAAGGACAATTGCAGTCTCATACTAAC	660

B0510_3175	TACCCAGCGACTGATGGAATAAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCCAACGCGTCAATCA	720
BcT4_9475	TACCCAGCGACTGATGGAATAAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCCAACGCGTCAATCA	720
BC1G_03590	TACCCAGCGACTGATGGAATAAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCCAACGCGTCAATCA	720

B0510_3175	ACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTGACAGACAAAGCG	780
BcT4_9475	ACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTGACAGACAAAGCG	780
BC1G_03590	ACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTGACAGACAAAGCG	780

B0510_3175	AACTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGAAAGCACTAGGAATGAA	840
BcT4_9475	AACTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGAAAGCACTAGGAATGAA	840
BC1G_03590	AACTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGAAAGCACTAGGAATGAA	840

B0510_3175	CATGGGTACATTCGATTACATGATAGTCGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATC	900
BcT4_9475	CATGGGTACATTCGATTACATGATAGTCGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATC	900
BC1G_03590	CATGGGTACATTCGATTACATGATAGTCGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATCATC	900

B0510_3175	TGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGTATAGTGGAAGTCTACCTCGGCTCC	960
BcT4_9475	TGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGTATAGTGGAAGTCTACCTCGGCTCC	960

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

BC1G_03590 TGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGTATAGTGAAGTCTACCTCGGCTCC 960

B0510_3175 CACTACTTCTCCTACAACATCACCAGGTGGCACCCTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTTC 1020
 BcT4_9475 CACTACTTCTCCTACAACATCACCAGGTGGCACCCTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTTC 1020
 BC1G_03590 CACTACTTCTCCTACAACATCACCAGGTGGCACCCTAAGTTATGTTTTTATTGGAATTTTC 1020

B0510_3175 TAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTTAGTGCGGTGCTCTATACAGC 1080
 BcT4_9475 TAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTTAGTGCGGTGCTCTATACAGC 1080
 BC1G_03590 TAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTTAGTGCGGTGCTCTATACAGC 1080

B0510_3175 CAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTAT 1140
 BcT4_9475 CAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTAT 1140
 BC1G_03590 CAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTAT 1140

B0510_3175 GCAAATCTTACTATTCTCAATGCTTGTGA 1170
 BcT4_9475 GCAAATCTTACTATTCTCAATGCTTGTGA 1170
 BC1G_03590 GCAAATCTTACTATTCTCAATGCTTGTGA 1170

B0510_640/BcT4_797 (porcentaje de identidad: 99,7%)

BcT4_797 ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCG 60
 B0510_640 ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCG 60

BcT4_797 CCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAAGTGAATGTCTTGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCT 120
 B0510_640 CCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAAGTGAATGTCTTGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCT 120

BcT4_797 TCCGCTACCGGTACTAGTGGTGGTTACTACTACTCCTTCTGGACCGATGGAAGCGGTGGT 180
 B0510_640 TCCGCTACCGGTACTAGTGGTGGTTACTACTACTCCTTCTGGACCGATGGAAGCGGTGGT 180

BcT4_797 GTTACATACTCCAACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTAACAAGGGT 240
 B0510_640 GTTACATACTCCAACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTAACAAGGGT 240

BcT4_797 AACTTCGTCGGTGGAAAAGGATGGGCTGTTGGTTCAGAGCGGTAAG-TTTTTTTTTTCTT 299
 B0510_640 AACTTCGTCGGTGGAAAAGGATGGGCTGTTGGTTCAGAGCGGTAAGTTTTTTTTTTCTT 300

BcT4_797 CCCTTCGTCATACATGAAAAGACATCAAATAATTTCTCCCGCAAAGCTCCATCTCCTAC 359
 B0510_640 CCCTTCGTCATACATGAAAAGACATCAAATAATTTCTCCCGCAAAGCTCCATCTCCTAC 360

BcT4_797 ACCGGATCCTACAAACCCAACGGAACTCCTACCTCTCCGCTATGGTTGGACTACCTCC 419
 B0510_640 ACCGGATCCTACAAACCCAACGGAACTCCTACCTCTCCGCTATGGTTGGACTACCTCC 420

BcT4_797 CCCCTCATCGAATACTACATCGTCGAAGACTTTGGCACCTACGATCCCTCCTCCGCCGCC 479
 B0510_640 CCCCTCATCGAATACTACATCGTCGAAGACTTTGGCACCTACGATCCCTCCTCCGCCGCC 480

BcT4_797 ACCGAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTTCCACATACAAGATCCTCGAGACCACCCGT 539
 B0510_640 ACCGAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTTCCACATACAAGATCCTCGAGACCACCCGT 540

BcT4_797 ACAAACCAACCTTCCGTTCAAGGAAGTGTACCTTCAAGCAATACTGGTCCGTCCGTACT 599
 B0510_640 ACAAACCAACCTTCCGTTCAAGGAAGTGTACCTTCAAGCAATACTGGTCCGTCCGTACT 600

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

BcT4_797 AGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCACCACTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTG 659
 B0510_640 AGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCACCACTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTG 660

BcT4_797 GGATTGACTTTGGGCTCAACCTACAACCTACCAAATTGTTGCTGTTGAGGGTTACCAAAGC 719
 B0510_640 GGATTGACTTTGGGCTCAACCTACAACCTACCAAATTGTTGCTGTTGAGGGTTACCAAAGC 720

BcT4_797 AGTGGTTCCGCTTCCATCACTGTTTCTTAA 749
 B0510_640 AGTGGTTCCGCTTCCATCACTGTTTCTTAA 750

BC1G_13645.1/BC1G_03590.1 (Porcentaje de identidad: 39.5%)

BC1G_13645.1 -----ATGATTACCTTTTC-CAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCG 51
 BC1G_03590.1 ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATAT 60
 ..:* ***** ** * . *** * .*: **:*. *.* * :**.*.

BC1G_13645.1 CTCGCCATTCCGGGTTCCATTCTC-----CCAAAGCGG-----AGCCC-AATGAATTT 98
 BC1G_03590.1 CCAGCCAACCTCAAGTTTGGAGCTCGTCGATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAAC 120
 * .****: *..** * : ** * .*** ** ** * * .**.*:

BC1G_13645.1 TGT-----TCTCCAACGCAACGAAAGCTCTCTTGTTCGTCGTCGCAACTCCAAATTACG- 151
 BC1G_03590.1 AGTGGTTTGTATCCATATTTCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCTGATTAGGT 180
 :** * .****: . .*. .** : * ** * . * **... ***:**** *

BC1G_13645.1 --AACAAAGATTATACGACTG-----GTGGAGATGTAATCTACACACCAT---CC 195
 BC1G_03590.1 GGATACTACTATTCCCTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGCT 240
 :....*:*:* * :*** ** * *****: * ** ***..: *

BC1G_13645.1 GGCAGCTCTTTCACTGTAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTCTGTTGGTCTTGGCTGG 255
 BC1G_03590.1 GGTGGCGAGTACAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAATCTTGTGGTGGAAAGGGCTGG 300
 ** .** .*:**:* :* :*****. .*. * .** ***** * ***:..: *****

BC1G_13645.1 ACAACTGGATCTACTAAGTGAG--TCATTCTCACACTCACTAATGAAAAGATTTCATGAA 313
 BC1G_03590.1 AATCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTTAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAAGATT 360
 *..:*****: * .***** . * * .*: : ***: * : .:***:*. :*:** * . * :..:

BC1G_13645.1 ATGAAAACCTGATAATACTTAAACATACAGTCTCTATA-----AACTTCAGCGGCACTTT 365
 BC1G_03590.1 ATTGCATCTGCTAACATCTATCTTAATTACCTGTAGGCTGTTACCTATAGTGGCAGTA 420
 ** ..*:***.*** * ***:**.*. :****.** * .*: ** ***** * :

BC1G_13645.1 CGGCATCGGATCCGGCACCGCCCTCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCACTCGT 425
 BC1G_03590.1 CAG--TCC-AAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTAT 477
 . ** *:. ****.*. * : ** ** .**** ** ***:*. .*:**:* * .*

BC1G_13645.1 AGAATACTACATCGTCGAAGACAGCG---CATCTCCCCCAGTTTCGGA---ACCGTCAA 479
 BC1G_03590.1 TGAATACTATGTTGTCGAGAACTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAA 537
 :***** * .*****.**: ** ***.* . **.* : ** * ** * **

BC1G_13645.1 AGGCAGCGTCACAAGCGACGG-----GTCAAGCTAT----- 510
 BC1G_03590.1 AGGTACCGTGGTTAGTGACGGGACCACTTGTAAAGTCAAACCTTCTGTCACCTTCTATATCT 597
 *** * ** . :* * ***** *****.*:

BC1G_13645.1 -----ACCATT----- 516
 BC1G_03590.1 CCCAAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGCGAAGGACAATTGCAGTCTCATACCT 657
 :

BC1G_13645.1 -----TGGGAAAAT-----CAACGTGTGAA 536
 BC1G_03590.1 AACTACCCAGCGACTGATGGAATAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCCAACCGCTCAA 717
 .*: ***** ** **

BC1G_13645.1 TGAACCTTCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAAACAGTACATCTCGGTGCGATCTTCCC 596
 BC1G_03590.1 TCAACCATCTATCATTGGTACTGTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTTCGACAGACAAA 777
 * ****:* ** * .*:**:* ** * ** ***:* **.* : ** * ** * . :*..

BC1G_13645.1 GCGGAAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGAT 656

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

BC1G_03590.1 GCGAACTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGAAAGCACTAGGAAT 837
 .*.:** **.*.*.*. .*.*****.* *****..*.*.*.*.*

BC1G_13645.1 GAATTTGGGAACGCTTAATTACCAGGTTTTGGCGGTGGAGG----- 698
 BC1G_03590.1 GAACATGGGTACATTCGATTACATGATAGTCGCAACAGAAGGTTACTTCTCTAGTGGATC 897
 *** :*****:* * .*****.:*.: * **.. .*.**

BC1G_13645.1 -----GTGGGTGGTGAAGGGG-----CTGCTACG-- 723
 BC1G_03590.1 ATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTATAGTGGAAAGTCTACCTCGGC 957
 * *.***** . * * **.* :**

BC1G_13645.1 -----CAG-----ACGGTTAGTTAG----- 738
 BC1G_03590.1 TCCCACTACTTCTCTACAACATCACCAGGTGGCACCCTAAGTTATGTTTTTATTGGAAT 1017
 *** ** **.******

BC1G_13645.1 -----
 BC1G_03590.1 TTCTAGATTGTCATAGAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTTAGTGCGGTGCTCTATAC 1077

BC1G_13645.1 -----
 BC1G_03590.1 AGCCAATGTGGTGGAACTGGATTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAG 1137

BC1G_13645.1 -----
 BC1G_03590.1 TATGCAAATTCTTACTATTCTCAATGCTTGTGA 1170

BC1G_13645.1/BcT4_797 (Porcentaje de identidad: 54%)

BC1G_13645.1 ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCT----ACCTCGCT-CG 55
 BcT4_797 ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCG 60
 ***.*.*:* :** : ** *** *.*.*: .**.*.*:** *: :* ** * **

BC1G_13645.1 CCATTCCGGGTTCATTCTCCCAAAGCGG-----AGCCC-AATGAATTTTGTCTCTCC 106
 BcT4_797 CCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAAGTGAATGTCTTGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCT 120
 *** * ** :** .**:* *.*.* :**.. **.*.*. ***: **

BC1G_13645.1 AACGCAACGAAAGCTCTCTTGTTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGA 166
 BcT4_797 TCCGCTAC--CGGTACTAGTGGTGGT--TACTACTACTCCTTCTGGACCG---ATGGAA 172
 :.***:* ** .* :** .** * ** *.*.***.*.*.*.*.*.*.*.*.* **.*

BC1G_13645.1 CTGGTGGAGATGTAATCTACACACCATCCGGCAGCTCTTTCACTGTAGATTGGTCA---A 223
 BcT4_797 GCGGTGGTGTACATACTCCAACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTA 232
 *****:*.*. *.:**.*.*.. * **.. .* .:*. :* **.. **.*.*. *

BC1G_13645.1 CCGAGGATGATTTTGTCTGGTCTTGGCTGGACAACCTGGATCTACTAAGTGAGTCATTC 283
 BcT4_797 ACAAGGGTAACCTTCGTGGTGGAAAAGGATGGGCTGTTGGTTCGAGCGGTAAGTTTTTT 292
 .*.***.*.* ** **** ***:.:**.***.*.: ***:****.*** :**

BC1G_13645.1 CTCACACTCACTAATGAAAAGATTTCATGAAATGAAAAGCTG-ATAACTTAAACATACAGT 342
 BcT4_797 TTTCTTCCCTTCGT-----CATACATGAAAAGACATCAAATAATTTCTCCCGCAAAGC 347
 * .*: * .*.** ***:*****:*.*.*:.. *****: *..* .**

BC1G_13645.1 CCTATAAACTTCAGCGGCACTTTCGGCATCGGATCCGGCACCGCCCTCCTCTCCATCTAC 402
 BcT4_797 TCCATCTCCTACACCGGATCCTACAAACCC---AACGGAACTCCTACCTCTCCGTCTAT 404
 * **.:**:* **.*:* *:*..... * :.***.*.* ** :*****.***

BC1G_13645.1 GGTGGTCCGAAAATCCACTCGTAGAATACTACATCGTGAAGACAGCG---CATC---T 456
 BcT4_797 GGTGGACTACCTCCCCCTCATCGAATACTACATCGTGAAGACTTTGGCACCTACGAT 464
 *****:* ..*.: **.***.*.******: * *:* * *

BC1G_13645.1 CCCCCAGTTTCGGAACCGTCAAAGGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATAACCATT 516
 BcT4_797 CCTCCTCCGCCGCCACCGAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTCCACATAACAAGATC 524
 *** **:* ** .*****:.*:**********.: ***** **.* **.* **

Anexo I: Secuencias de los genes y xilanasas de las familias GH10 y GH11 de *B. cinerea*

BC1G_13645.1 TGGGAAAATCAACGTGTGAATGAACCTTCCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACCAGTAC 576
 BcT4_797 CTCGAGACCACCCGTACAAACCAACCTTCCGTTCAAGGAAGTGTACCTTCAAGCAATAC 584
 .*.* ** *****.* :***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

BC1G_13645.1 ATCTCGGTGCGATCTTCCCCCGGAAAGTGGGACAGTGACGGTAGAGAATCATTTTCAG 636
 BcT4_797 TGGTCCGTCCGTACTAGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCACCACTGCAAACCATTTTGCA 644
 : ** ** **::**:* *.**.* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** :*..** ***** ..

BC1G_13645.1 GCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAATTTGGG---AACGCTTAATTACCAGGTTTTGGCGGTG 693
 BcT4_797 GCCTGGAAGAAGTTGGGATTTGACTTTGGGCTCAACCTACAACCTACCAAATTTGTTGCTGTT 704
 ** ***. . . * ***. :***.***** ** : ** *****.* ** ** ** ** **

BC1G_13645.1 GAGGGGTGGGGTGGTGAGGGGGCTGCTACGCAGACGGTTAGTTAG 738
 BcT4_797 GAGGGTTACCAAAGCAGTGGTTCGCTTCCATCACTGTTTCTTAA 749
 ***** * . :.* .. ** * ***: * . : ** ***: ***.

BC1G_03590.1/ BcT4_797 (Porcentaje de identidad: 42,3%)

BC1G_03590.1 ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATAT 60
 BcT4_797 ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCG 60
 *****:**: . . . : * * **.* .** : *:***.***.***.*:**:**:.* . .

BC1G_03590.1 CCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGTCG-ATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAAC 119
 BcT4_797 CCAGCCGCG-----GCACCCGTCAGCGAGAAGTGAATGTCTTGCAAGAAAG---- 107
 *****.* . *..* ***** . . ***** *.* . **:***:* . *:**

BC1G_03590.1 CAGTGGTTTGTATCCATATCCCCCGAGTAGTTTTCTTTATGTTGACCTTCTGATTAGG 179
 BcT4_797 -AGCG--TTGACTTCTTCCGCTACCGG-----TACTAGT--GG 140
 ** * ***:.* *:* . * .*** . *..**.* **

BC1G_03590.1 TGGATACTACTATTCCTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGC 239
 BcT4_797 TGGTTACTACTACTCCTTCTGGACCGATGGAAGCGGTGGTGTACATACTCCAACGGAGC 200
 .*:**:** ** ** ** ** ** .**.* * * :*.*:**:**:* :*.* ** **:***

BC1G_03590.1 TGGTGGCGAGTACAAACTTCAATGGTCAGG--AAATGGCAATCTTGTGGTGGAAAGGG 296
 BcT4_797 CAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTAACAAGGGTAACTTCGTCGGTGGAAAAGG 260
 ..*** *.* ** . . *:*..**:*.* ** .** ** ** * ** *****.***

BC1G_03590.1 CTGGAATCCTGGAAGTGCTAAGTTGGTTTAAAAGTTCTCTTGATCTTCTATCATGACTAA 356
 BcT4_797 ATGGGCTGTTGGTTCAGCGGTAAGTTTTTTTTTCTTCCCTTCGTCATACATGAAAAG 320
 .***.* ***: : * . .**:*:**:**: : * ** :** ***:**:**:**:.*

BC1G_03590.1 GATTATGTCATCTGCTAACATCTATCTTAATTACCTGTAGGGCTGTTACCTATAGTGGCA 416
 BcT4_797 -----ACATCAAACCTAATTTCT----CCCGCAAAGCTCCATCTCCTACACCGGAT 366
 :* :*:**:.*:** ** . * .:** * . * :***** * **.*

BC1G_03590.1 CGTACAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTA 476
 BcT4_797 CCTACAAACCCAACGGAACTCCTACCTCTCCGTCTATGGTTGGACTACCTCCCCCTCA 426
 * ***. :**.* ** ** ***: ** ** ** * ***** *****:***.* ** ** *

BC1G_03590.1 TTGAATACTATGTTGTCGAGAAGTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGA 536
 BcT4_797 TCGAATACTACATCGTCGAAGACTTTGGCACCTACGATCCCTCCTCCGCCGCCACCGAAA 486
 * ***** . * *****.* ** ** ** ** ** ** ** ** ** :*:* * .** ** ** :.*

BC1G_03590.1 AAGGTACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTGTAAAGTCAAACCTTCTGTCACTTCTATATTC 596
 BcT4_797 TCGG----- 490
 :.***

BC1G_03590.1 TCCCAAATTTTACAGTATTGCCACCTTTGACTTGCGAAGGACAATTGCAGTCTCATAACC 656
 BcT4_797 -----CAGTGTACCTCC-----GACGGTTCCA----- 513
 ***** * .**:*** *****.* **

BC1G_03590.1 TAACTACCCAGCGACTGATGGAATAATTTCCAGATAAGATCTACCAAACCCAACCGCTCA 716

```

BcT4_797 -----CATACAAGATCCTCGAGACCACCCGTACAA 543
                ** * ***** :* *.***...** . .*

BC1G_03590.1 ATCAACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTTCGACAGACAA 776
BcT4_797 ACCAACCTTCCGTTCAAGGAAGTCTACCTTCAAGCAATACTGGTCCGTCGGTACTAGCA 603
                * *****:** . * .:***:***** ***** :* ***** ***** ** **:. . * .*

BC1G_03590.1 AGCGAAGTGGTGGTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGGAAAGCACTAGGAA 836
BcT4_797 AGCGTACGAGCGGTACCGTCACCCTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTGGGAT 663
                ****:** . * ***** .** ** * ** * ***** .:*** ***** . . . * .***:

BC1G_03590.1 TGAACATGGGTACATTTCGATTACATGATAGTCGCAACAGAAGTTACTTCTCTAGTGGAT 896
BcT4_797 TGACTTTGGG----- 673
                *** . :****

BC1G_03590.1 CATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGGAGGTGGTGATAGTGGAAGTCCTACCTCGG 956
BcT4_797 -----

BC1G_03590.1 CTCCCCTACTTCTCCTACAACATCACCAGGTGGCACCCTAAGTTATGTTTTTATTGGAA 1016
BcT4_797 -----CTCAACCTACAAC----- 687
                ** .:*****:

BC1G_03590.1 TTTCTAGATTGTCATAGAAAAATTACTGATTCAAGACGTAATTTAGTGCGGTGCTCTATA 1076
BcT4_797 -----

BC1G_03590.1 CAGCCAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAA 1136
BcT4_797 --ACCAAATTGTTG---CTG---TTGAGGGTTACCAAAGCAGTGGTTCCG---CTTCCAT 736
                .****: ** ** *** ** .*****. ***:**:** :***** *** **:

BC1G_03590.1 GTATGCAAATTCCTACTATTCTCAATGCTTGTGA 1170
BcT4_797 ---CACTGTTTCTTAA----- 749
                .*:.:*****.
    
```

2.3. Análisis de los genes BC1G_13645.1, BC1G_03590.1 y BcT4_797, proteínas que codifican y diseño de siRNAs

En las secuencias de los genes, se señalan en minúsculas los posibles intrones y en rojo y subrayado la región elegida para formar parte de la construcción silenciadora.

En las secuencias de las proteínas se señala la secuencia señal en rojo.

>BC1G_13645.1(738 pb)

```

ATGATTACCTTTTCCAGTCTTCTCGTCACATTCTCGGCAATTTCTACCTCGCTCGCCATTCCGGGTTCCATTCTCCCAAAGCGGAGC
CCAATGAATTTTGTCTCCAACGCAACGAAAGCTCTTGTTCGTGCAACTCCAAATTACGAACAAGATTATACGACTGGTG
GAGATGTAATCTACACACCATCCGGCAGCTCTTTCCTGATAGATTGGTCAACCGAGGATGATTTTGTGCTTGGTCTTGGCTGGAC
AACTGGATCTACTAAgtgagtcattcctcactcactaatgaaaagattcatgaaatgaaaactgataacttaacatacagTCCTATAAACTTCAGCGGCACCTTTCGGCA
TCGGATCCGGCACCGCCCTCTCCATCTACGGTTGGTCCGAAAATCCACTCGTAGAATACTACATCGTCAAGACAGCGCATC
TCCCCCAGTTTCGGAACCGTCAAAGGCAGCGTCACAAGCGACGGGTCAAGCTATAACATTTGGGAAAATCAACGTGTGAATGA
ACCTTCCATTGTAGGAACCGCGACTTTTAACCAGTACATCTCGGTGCGATCTCCCCGCGGAAAAGTGGGACAGTGACGGTA
GAGAATCATTTTCAGGCTTGGGCCGCGCTGGGGATGAATTTGGGAACGCTAATTACCAGTTTTGGCGGTGGAGGGGTGGGGT
GGTGAGGGGGCTGCTACGCAGACGGTTAGTTAG
    
```

siRNA_4: 5'- AACCGCGACTTTTAACCAGTACATCTCGGTGCGATCTCCCCGCGGAAAA (555 al 604 del gen)

BC1G_13645.1 (proteína 223 aa)

MITFSSLLVTFSAISTSLAIPGSILPKRSPMNFVLQRNESSLVRRATPNYEQDYTTGGDVIYTPSGSSFTVDWSTEDDFVVLGWTTGST
NPINFSGTFIGSGTALLSIYGWSENPLVEYYIVEDSASPPSFGTVKGSVTSDDSSYTIWENQRVNEPSIVGTATFNQYISVRSSPRKSGTV
TVENHFQAWAALGMNLGTLNYQVLAVEGWGGEGAATQTVS*

>BC1G_03590.1

ATGGTATCATACAAAGCTTTTCTCATTACTCTTGCTGCTGTCACGAGAGTCTTAACATATCCAGCCAACCTCAAGTTTTGAGCTCGT
CGATCGAAGTGGGACACCTAGCTCTACTGGAACAGTGGTttgtatccatattccccgagtagtttctttatggtgacctcctgattagGTGGATACTACTATTC
CTTCTGGACAGATGGAGGTGCAGATGTTACTTATACAAATGGTGTGTTGGCGAGTACAACTTCAATGGTCAGGAAATGGCAA
TCTTGTGGTGGAAAGGGCTGGAATCCTGGAAGTGCTAAgttggtttaaagtctctgatctctcatgactaagattattgcatctgctaactctatcttaattacctgtaGG
GCTGTTACCTATAGTGGCACGTACAGTCCAAATGGCAACAGCTATCTTTCTCTCTATGGCTGGACAACATCACCTCTTATTGAATA
CTATGTTGTCGAGAACTTCGGTACATATGATCCAAGCACTGGAGCTACCTTGAAAGGTACCGTGGTTAGTGACGGAGCAACTTgta
agtcaaaactctgctactctatattctcccaaaattttacagtattgccactttgacttgcaagacaattgcatctcatacctaactaccagcgactgatggaataattccagATAAGATCTACCAA
ACCCAACGCGTCAATCAACCATCTATCATTGGTACTGCTACCTTTTATCAATATTGGTCTGTTTCGACAGACAAAGCGAACTGGTG
GTACCGTAACGACCGGAAATCATTTTAATGCTTGGAAAGCACTAGGAATGAACATGGGTACATTTCGATTACATGATAGTCGCAA
CAGAAGGTTACTTCTTAGTGGATCATCTGATATAACTGTTGGAAGTTCAACGGG**AGGTGGTGATAGTGGAAAGTCCTACCTCG**
GCTCCCACTACTTCTCTACAACATCACCAGGTGGCACCGtaagtattgtttttattggaatttctagattgcatagataaaaattactgattcaagacgtaatttagTGCGGT
GCTCTATACAGCCAATGTGGTGGAACTGGATTTACGGGTTCTCAATGCTGTGCATCCGGGACTTGCAAGTATGCAAATTCTTACT
ATTCTCAATGCTTGTGA

siRNA_5: 5'-AGGTGGTGATAGTGGAAAGTCCTACCTCGGCTCCCACTACTTCTCTACAA-3' (928 – 977 del gen)

BC1G_03590.1 (proteína 282 aa)

MVSYKAFLITLAAVTRVLTYPANSSFELVDRSGTPSSTGTSGGYYSFWTDGGADVITYTNGAGGEYKLQWSGNGNLVGGKGNPNPGS
AKAVTYSGTYSPNGNSYLSLYGWTTSPLEIYYVVENFGTYDPSTGATLKGTVVSDGATYKIYQTRVNPQSIIGTATFYQYWSVRQTK
RTGGTVTTGNHFNAWKALGMNMGTFDYMIVATEGYFSSGSSDITVGSSTGGGDSGSPTSAPTTSPPTSPGGTTCGALYSQCGGTGFTGS
QCCASGTCKYANSYYSQCL*

> BcT4_797 (750 pb)

ATGGTTTCTGCATCTTCCCTCCTCCTCGCTGCATCAGCTATCGCAGGTGTCTTCTCCGCGCCAGCCGCGGCACCCGTCAGCGAGAA
CTTGAATGTCTTGCAAGAAAGAGCGTTGACTTCTTCCGCTACCGGTAAGTGGTGGTACTACTACTCCTTCTGGACCGATGGAA
GCGGTGGTGTACATACTCCAACGGAGCCAATGGTCAATATGCCGTAAGCTGGACCGGTAACAAGGTAACCTTCGTCGGTGGAA
AAGGATGGGCTGTTGGTTCCGAGCGgtaagtttttttccctcctctcgcatacatgaaaagacataaaactaatttctcccgcaagCTCCATCTCCTACACCGGATCC
TACAAACCAACGAAACTCCTACCTCTCCGTCTATGGTTGGACTACCTCCCCCTCATCGAATACTACATCGTCGAAGACTTTGG
CACCTACGATCCCTCCTCCGCCGCCACCGAAATCGGCAGTGTACCTCCGACGGTCCACATACAAGATCCTCGAGACCACCCGT
ACAAACCAACCTCCGTTCAAGGAAGTGTACCTTCAAGCAATACTGG**TCCGTCCGTAAGCAAGCGTACGAGCGGTACCG**
TCACCACTGCAAACCATTTTGCAGCCTGGAAGAAGTTGGGATTGACTTTGGGCTCAACTTACAACCTACCAAATTGTTGCTGTTG
AGGGTTACCAAAGCAGTGGTTCGCTTCCATCACTGTTTCTTAA

siRNA_6: 5'-TCCGTCCGTAAGCAAGCGTACGAGCGGTACCGTCAACCACTGCAAACCAT-3' (588 – 638 del gen)

BcT4_797 (proteína 228 aa)


```

BC1G_03590.1_protein      IEYYVVENFGTYDPSTGATLKGTVVSDGATYKIYQTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRQTK 174
BcT4_797_protein         IEYYIVEDFGTYDPSSAATEIGSVTSDGSTYKILETTRTNQPSVQGTATFKQYWSVRTSK 180
                          ****:*:*:*****:.* ** *:*.*:*:*:* * *.*:*:*: ***** ***** :*

BC1G_03590.1_protein      RTGGTVTTGNHFNFAWKALGMNMG-TFDYMIVATEGYFSSGSSDITVGSSTGGGDSGSPTS 233
BcT4_797_protein         RTSGTVTTANHFPAWKKLGLTLGSTYNYQIVAVEGYQSSGSASITVS----- 227
                          **.******.* ** ** *:*:* *:*:* **.* ** *:*:*.* **.*

BC1G_03590.1_protein      APTTSPTTSPGGTCGALYSQCGGTGFTGSQCCASGTCKYANSYYSQCL 281
BcT4_797_protein         -----
    
```

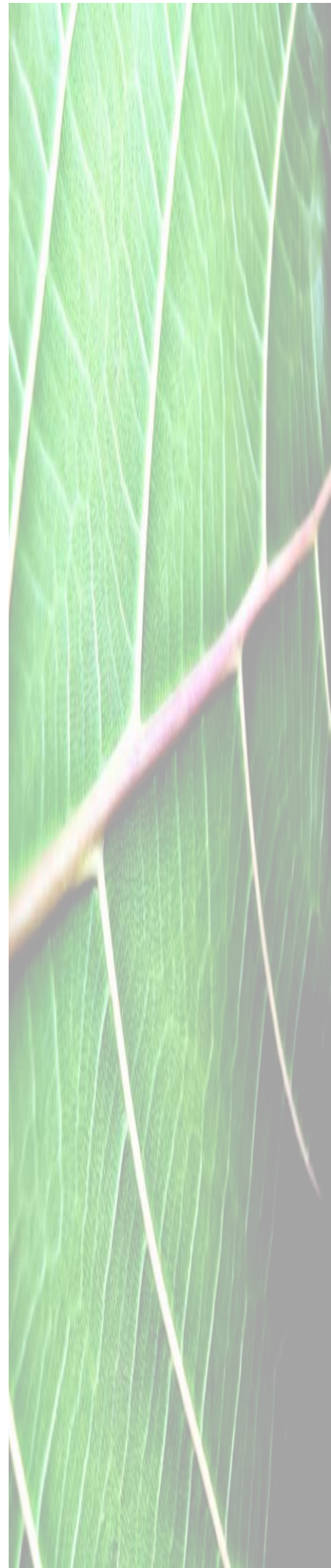
3. Secuencia del gen quimérico silenciador Hom_XyL

Se indican los 6 fragmentos de DNA que pertenecen a las familias GH-10 y GH-11. La región de 21 nt seleccionada por el programa SVM RNAi 2.como siRNA en cada secuencia. En verde se muestra la secuencia espaciadora, que posee una longitud de 22 pb.

Hom_XyL

AACCGCGACTTTT**AACCGAGTACATCTCGGTGCGA**TCTTCCCCGCGGAAAAAGGTGGTGATAGTGG**AAGTCCTACCTCGGCTCCCACT**ACTTCTCCTACAATCCGTCCGTACTAGC**AAGCGTACGAGCGGTACCGTC**ACCACTGCAAACCAGC
 GGCTGTCATCA**AAGCAAAC**TTTGGACAAGTGACACCAGAAAACAGCATTGTAGGCGGGGTG**AACGGTATAGTTA**
GCGTACCAGAGACAGGCATCACCACGGTGTCTCGGTCTCC**AAGCCCACTTCATCGTCGGCT**CCACCCCCAGCGAAGAG
 CTCGGCCGGCCTTAATTAA

ANEXO II



Anexo II

Imágenes ampliadas del ensayo de virulencia, con las cepas Bc-pNAH-XyL y Bc-pNDN-XyL-Tail.

Las hojas de tabaco se prepararon según se indica en el punto 13 del apartado de material y métodos. Se colocaron controles positivos en las zonas más cercanas al nervio central y en el borde de las hojas y entre los controles, se colocaron varias réplicas las colonias de hongos transformantes Bc-pNDN-XyL-Tail y Bc-pNAH-XyL. La numeración 1 (1.1 a 1.10) y 2 (2.1 a 2.10) pertenece a la cepa Bc-pNDN-Xyl-Tail y la numeración 3 (3.1 a 3.3) pertenece a la cepa Bc-pNAH-XyL.

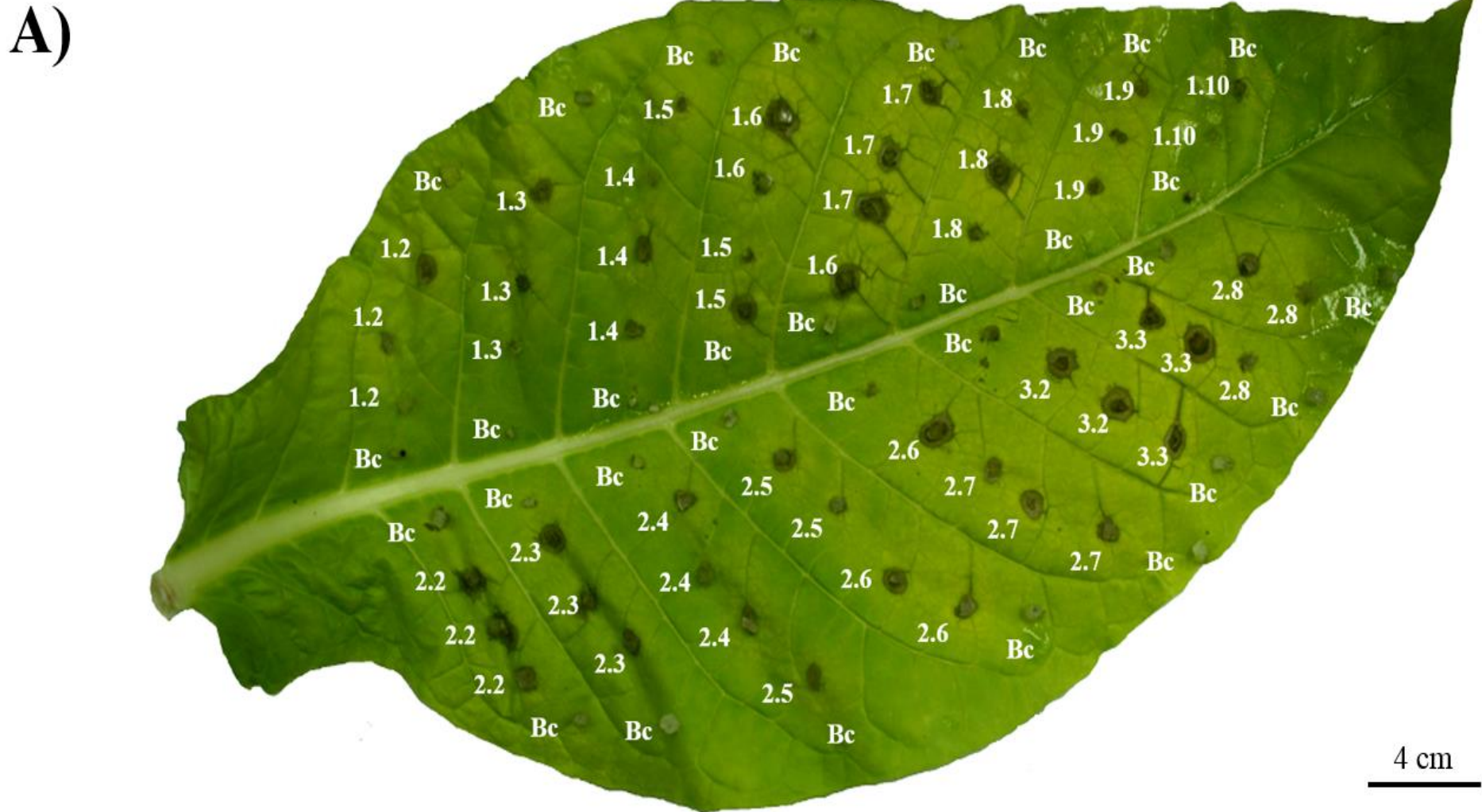


Figura A. Primera hoja de Tabaco (*Nicotiana tabacum*), a la que se le han colocado varios trozos de agar con micelio. Bc: control positivo B05.10 de *B. cinerea*. Numeración 1 y 2: agar con micelio de la cepa Bc-pNDN-XyL-Tail, hay varias colonias dentro de cada numeración. Numeración 3: agar con micelio de la cepa pNAH-XyL, con varias colonias dentro de esta numeración. La barra representa el tamaño escalado de la hoja.

B)

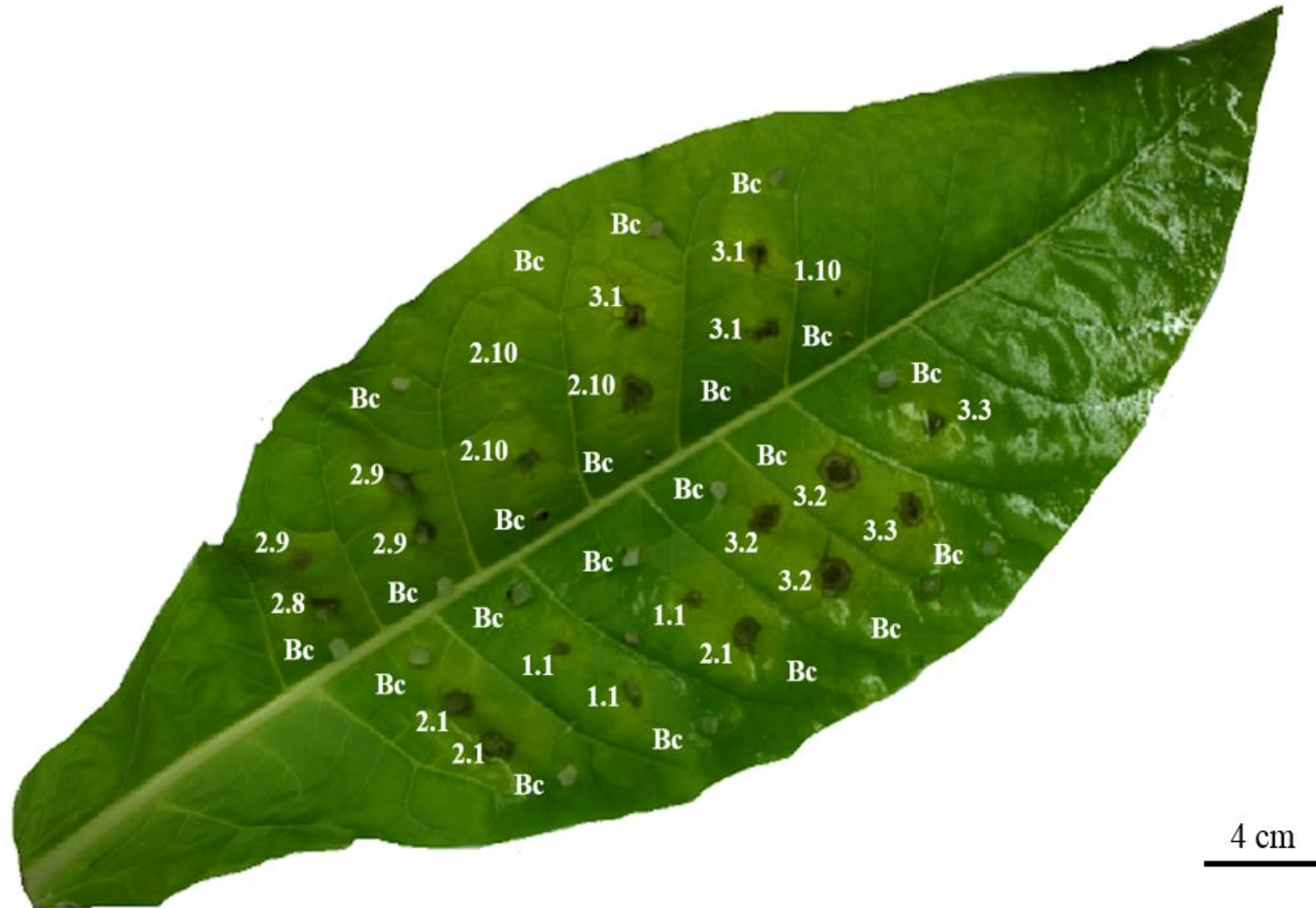


Figura B. Segunda hoja de Tabaco (*Nicotiana tabacum*), a la que se le han colocado varios trozos de agar con micelio. Bc: control positivo B05.10 de *B. cinerea*. Numeración 1 y 2: agar con micelio de la cepa Bc-pNDN-XyL-Tail, hay varias colonias dentro de cada numeración. Numeración 3: agar con micelio de la cepa pNAH-XyL, con varias colonias dentro de esta numeración. La barra representa el tamaño escalado de la hoja.