



Universidad
de La Laguna



FACULTAD DE CIENCIAS

SECCIÓN DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética

**Papel de las xilanasas extracelulares de
Botrytis cinerea en la virulencia**

**Role of extracellular xylanases in the
virulence of *Botrytis cinerea***

Trabajo de Fin de Grado

Glorian K. Mura Escorche

Grado en Biología

Julio 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	----------------------------------

Datos Personales

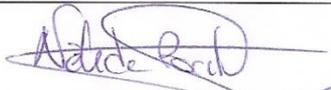
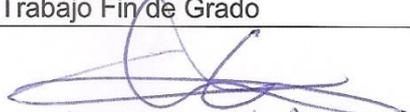
Nº DNI o pasaporte: AA4042813	Nombre y Apellidos: Glorian K. Mura Escorche
Teléfono: 617619715	Dirección de correo electrónico: alu0100773521@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

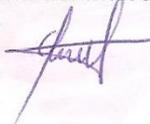
Papel de las xilanasas extracelulares de Botrytis cinerea en la virulencia.

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 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 4 de JULIO del 20

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 de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

**PAPEL DE LAS XILANASAS EXTRACELULARES DE
Botrytis cinerea EN LA VIRULENCIA**

**ROLE OF EXTRACELLULAR XYLANASES IN THE
VIRULENCE OF *Botrytis cinerea***

Trabajo de Fin de Grado

GLORIAN K. MURA ESCORCHE

Grado en Biología, Julio 2016

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 importancia.....	1
2. <i>Botrytis cinerea</i> secreta endo- β -1,4-xilanasas durante su ciclo de vida	1
3. El silenciamiento por RNA como herramienta para silenciar las cinco xilanasas secretadas por <i>Botrytis cinerea</i>	3
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
1. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas	7
2. Organismos.....	7
3. Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i>	8
4. Aislamiento de conidias	8
5. Obtención de los secretomas de las cepas fúngicas	9
6. Precipitación de proteínas	9
6.1. Precipitación con metanol-cloroformo.....	9
6.2. Precipitación con acetona.....	10
6.3. Precipitación con tricloroacético (TCA)	10
6.4. Precipitación con tricloroacético y metanol-cloroformo.....	10
7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	10
7.1. Preparación del gel de separación al 10%T	11
7.2. Preparación del gel de compactación al 4%T	11
7.3. Preparación de las muestras	11
7.4. Desarrollo de la electroforesis y tinción.....	11
8. Zimograma	12
9. Electroforesis en condiciones nativas	12
10. Purificación de DNA genómico de <i>B. cinerea</i>	12
11. Reacciones de PCR	13
12. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
1. Análisis bioinformático de las endo- β -1,4-xilanasas de la familia 10 y 11 secretadas por el hongo <i>B. cinerea</i>	15
2. Optimización de la detección por zimograma de las xilanasas secretadas por <i>B. cinerea</i> ...	17
3. Optimización de las condiciones de crecimiento de <i>B. cinerea</i>	20
3.1. Valoración del efecto del pH del medio en la secreción de las xilanasas de <i>B. cinerea</i> ...	20
3.2. Valoración del efecto de la fuente de carbono del medio en la secreción de las xilanasas de <i>B. cinerea</i>	21
4. Análisis de los secretomas de las cepas silenciadas.....	22

5. Análisis de la estabilidad de las construcciones silenciadoras en las cepas transformantes	24
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
REFERENCIAS A PÁGINAS WEB	30

RESUMEN

En la interacción patógeno-hospedador que establece *Botrytis cinerea* con distintas especies vegetales, las proteínas que secreta al medio juegan un papel decisivo en el resultado final del proceso infeccioso. Se han identificado cinco endo- β -1,4 xilanasas en la anotación del genoma del hongo, enzimas que llevan a cabo el primer paso en la vía de degradación del xilano, principal hemicelulosa de la pared celular vegetal. En este trabajo, se ha realizado un análisis *in silico* de las secuencias de estas 5 enzimas y se han ensayado diferentes condiciones de crecimiento del hongo para analizar la presencia de las cinco proteínas en los secretomas obtenidos, por medio de la técnica del zimograma. Además, la puesta a punto de esta técnica, ha permitido analizar la actividad xilanasa en los cultivos de cepas previamente obtenidas en nuestro laboratorio, en las que se indujo el silenciamiento de dichas enzimas. Finalmente, se estudió mediante PCR la estabilidad de la construcción silenciadora en el genoma de las cepas silenciadas.

PALABRAS CLAVE:

Botrytis cinerea, secretoma, silenciamiento por ARN, xilanasas, zimograma,

ABSTRACT

In the pathogen-host interaction established between *Botrytis cinerea* and different plant species, secreted proteins play a key role in the infection process. Five endo- β -1,4- xylanases have been annotated in the fungus genome, enzymes that carry out the first step in the xylan degradation, the main hemicellulose of plant cell wall. In this work, the sequences of these five enzymes were studied *in silico*, and different growth conditions of the fungus have been tested to analyze the presence of the five proteins in the secretome, through the technique of zymogram. In addition, the set-up of this technique has allowed to analyze the xylanase activity of strains previously obtained in our laboratory, in which the silencing of these enzymes was induced. Finally, the stability of the silencing constructs in the genome of silenced strains was studied by PCR.

KEYWORDS

Botrytis cinerea, RNA silencing, secretome, xylanases, zymogram.

INTRODUCCIÓN

1. *Botrytis cinerea* y su importancia

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente conocido, en el que destaca la especie *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, considerado como el segundo hongo en importancia en relación a su relevancia económica y científica (Dean *et al.*, 2012). Taxonómicamente pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* y familia *Sclerotiniaceae* (Williamson *et al.*, 2007). Su trascendencia radica en que es capaz de infectar al menos 1400 especies distintas de plantas bajo cualquier condición y en prácticamente cualquier área geográfica (Elad *et al.*, 2007; Prins *et al.*, 2000), causando la enfermedad conocida comúnmente como “podredumbre gris”.

En Canarias este hongo tiene una gran incidencia, afectando a cultivos mayoritarios como son la vid y el tomate, con gran importancia económica en las islas (<http://www.gobcan.es/agricultura>). En el año 2011, el gasto total en productos fitosanitarios en Canarias fue superior a 70 kg/ha, superando al resto de comunidades autónomas, correspondiendo el 22,4% del gasto total a fungicidas (<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura>).

Precisamente, el uso extensivo de fungicidas como método de control ha provocado la aparición de cepas resistentes de *B. cinerea*. Además, lleva asociados serios riesgos de contaminación ambiental y supone grandes costes económicos, por lo que ha surgido la necesidad de buscar estrategias de control alternativas.

2. *Botrytis cinerea* secreta endo- β -1,4-xilanasas durante su ciclo de vida

En la búsqueda de nuevos métodos que permitan un control más eficaz del hongo, que sean menos dañinos para el medio ambiente y la salud y que presenten menores costes económicos, cobran especial importancia los factores de patogenicidad, entendidos como aquellos factores que contribuyen de manera relevante a la germinación de las esporas y la penetración del hongo a través de los tejidos de la planta, a la invasión, colonización, maceración y, en definitiva, a la infección del tejido vegetal y a la dispersión de la enfermedad.

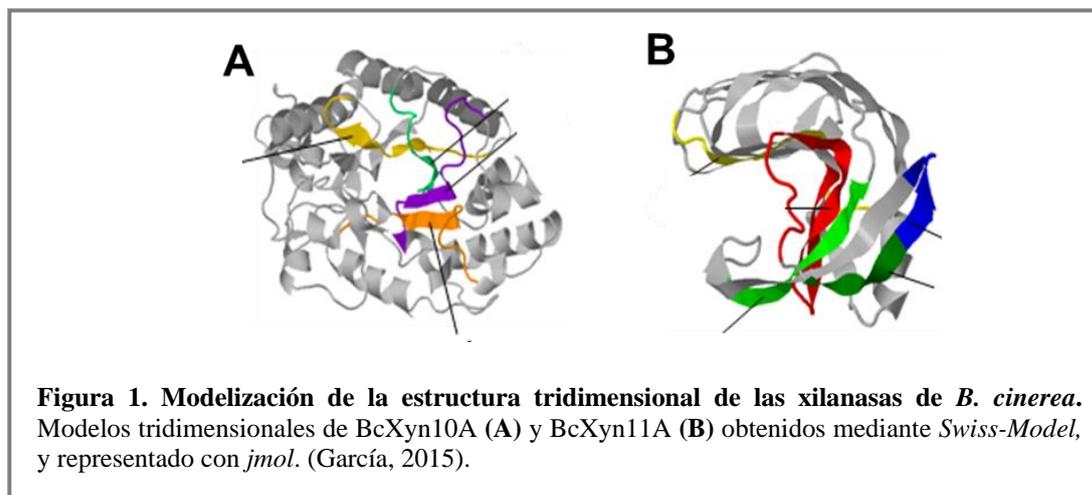
El ciclo de vida de *B. cinerea* comienza con la adherencia de las conidias al tejido vegetal y su posterior germinación (van Kan, 2006). Estos primeros momentos de la interacción hongo – planta son decisivos para el establecimiento de la infección, detectándose numerosas proteínas secretadas por el hongo que actúan sobre la pared celular vegetal como principal

diana. Pectinasas, celulasas y xilanasas (Espino *et al.*, 2010) (González *et al.*, 2014), responsables de la degradación de la pectina, la celulosa y el xilano, respectivamente, son las más abundantes.

El xilano es el principal componente hemicelulósico de la pared celular vegetal (Collins *et al.*, 2005) y su estructura consiste en un esqueleto de residuos de D-xilosa unidos mediante enlaces β -1,4, con cadenas laterales compuestas por una variedad de sustituyentes en los carbonos 2 ó 3 de las unidades de xilosa (ten Have *et al.*, 2002).

La degradación de este complejo polisacárido requiere de la acción sinérgica de distintas enzimas hidrolíticas (Subramaniyan y Prema, 2002). Las endo- β -1,4-xilanasas (E.C. 3.2.1.8) actúan en regiones de pocas sustituciones rompiendo la cadena lineal del polisacárido y dando lugar a xilosa. La inmensa mayoría de la enzimas descritas con esta actividad pertenecen a las familias 10 y 11 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).

La estructura general del dominio catalítico de las xilanasas de la familia 10 es un barril (β/α)₈ que se asemeja a una ensaladera, con el sitio activo situado en una hendidura, mientras que las de la familia 11 adopta un plegamiento “ β -jelly roll” (**Fig. 1**). Las endoxilanasas de la familia 10 suelen tener punto isoeléctrico ácido y un peso molecular mayor de 30 kDa, mientras que las de la familia 11, en general, tienen punto isoeléctrico básico y menor peso molecular (~22 kDa) (Collins *et al.*, 2005). Con respecto a su actividad, las xilanasas de la familia 10 son, generalmente, menos selectivas que las de la familia 11 y, a diferencia de estas últimas, pueden atacar a distintos polisacáridos (Belien *et al.*, 2006).



El análisis *in silico* del genoma de *B. cinerea* reveló la existencia de cinco genes que codifican para posibles endo- β -1,4-xilanasas, dos de ellas pertenecientes a la familia 10 de las glicosil hidrolasas y las tres restantes, a la familia 11 (García, 2014), anotadas como BcXyn10A, BcXyn10B, BcXyn11A, BcXyn11B y BcXyn11C (**Tabla 1**). Hasta el momento, sólo se ha estudiado una de ellas, la endo- β -1,4 xilanasas BcXyn11A, destacando su papel en la virulencia del hongo (Brito *et al.*, 2006) y en actuar como elicitor de la respuesta de defensa de la planta independientemente de su actividad enzimática (Noda *et al.*, 2010). Sin embargo, la existencia de, al menos otras cuatro enzimas con la misma actividad, ha dificultado valorar de forma global la relevancia de la degradación del xilano en el proceso infeccioso desarrollado por el hongo. La falta de marcadores selectivos para este hongo hace prácticamente imposible la generación de un mutante múltiple en los cinco genes, por lo que se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas de biología molecular para abordar este objetivo.

Tabla 1. Genes que codifican para las endo- β -1,4-xilanasas del secretoma analizadas en el presente trabajo.

Anotación en el genoma de <i>B. cinerea</i> ^a	Anotación en el presente trabajo
BC1G_00576.1	Xyn10A
BC1G_01778.1	Xyn10B
BCT4_797	Xyn11A
BC1G_13645	Xyn11B
BC1G_03590.1	Xyn11C

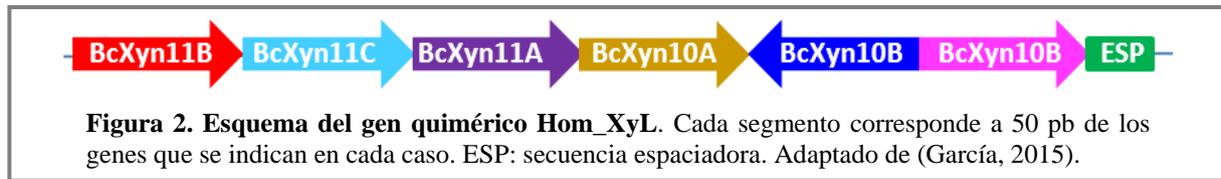
^aNotación utilizada en la primera secuenciación del genoma de *B. cinerea* B05.10 (Amselem *et al.*, 2011)

3. El silenciamiento por RNA como herramienta para silenciar las cinco xilanasas secretadas por *Botrytis cinerea*

El silenciamiento por ARN regula la expresión génica gracias a la participación de moléculas de ARN pequeñas de doble cadena (ARNdc) con secuencias homólogas al DNA o RNA diana. La interacción entre estas moléculas de ARNdc con el DNA/RNA diana provoca la modificación de la cromatina o la degradación del RNAm, impidiendo, como consecuencia última, la síntesis de la proteína codificada por el gen diana (Burroughs *et al.*, 2014).

La creación de cepas transformantes que expresan ARNdc exógeno para inducir el silenciamiento de diferentes genes, se ha llevado a cabo con éxito en *B. cinerea* (Espino *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2008; Schumacher *et al.*, 2008). Recientemente, en nuestro laboratorio, se han generado cepas silenciadas para las cinco xilanasas que codifica el genoma del hongo, por medio el método de silenciamiento múltiple conocido como “building block” (García, 2015).

Para ello, se diseñó un gen quimérico denominado *Homo_Xyl* (**Fig. 2**) en el que se incluyen 50 pb de cada gen de las 5 xilanasas (García, 2014).



A partir de la obtención de este gen se siguieron dos estrategias distintas con el fin de poder inducir la síntesis de RNAdc específicos para cada una de las cinco xilanasas en el hongo. Una de las estrategias consistió en generar dos construcciones en las que el gen quimérico fue clonado bajo el control del promotor *OliC*, pero en direcciones opuestas en cada una de ellas (García, 2014). Una de las construcciones fue integrada en el locus *niiA* de *Botrytis cinerea* y la segunda en el locus *niaD*. Los promotores dirigen simultáneamente la producción de RNA sentido y antisentido que hibridarán dentro de la célula generando los RNAdc deseados (**Fig. 3A**). Esta estrategia es conocida como “sentido-antisentido”. Las cepas transformantes obtenidas a partir de la transformación de la cepa silvestre con estas construcciones se denominaron BcXyl-DT2 (García, 2015).

La segunda estrategia seguida para generar el RNA de doble cadena fue generar una construcción en la que dos copias invertidas del gen *Homo_Xyl* se clonan separadas por un DNA espaciador no relacionado (ESP en **Fig. 2**). Esta construcción está integrada en el locus *niaD* del genoma del hongo, y también está bajo el control del promotor *OliC* (**Fig. 3B**) (García, 2014). La transcripción de esta construcción resultaría en una horquilla de ARN con una región de doble cadena homóloga a cada uno de los genes de las cinco xilanasas. Esta estrategia se la conoce como “tallo-bucle”, y las cepas transformantes obtenidas a partir de la transformación de la cepa silvestre con esta construcción se denominaron BcXyl-T2 (García, 2015).

La obtención de cepas de *B. cinerea* transformadas con DNA exógeno no es sencilla, ya que este hongo se caracteriza por ser un hongo multinucleado en todas las fases de su ciclo de vida (3-12 núcleos por célula) (Benito *et al.*, 2000; Shirane *et al.*, 1988). El aislamiento de homocariontes, es decir, cepas en las que todos sus núcleos hayan sido modificados por la integración del ADN exógeno y en las que además esta integración haya ocurrido de forma específica en el mismo locus, es una labor compleja y tediosa que es estrictamente necesaria cuando se desea obtener una cepa mutante *knockout* del hongo. Sin embargo, debido al propio mecanismo por el que se establece el silenciamiento por RNA, se plantea la duda de si este paso de purificación y aislamiento de homocariontes es necesario.

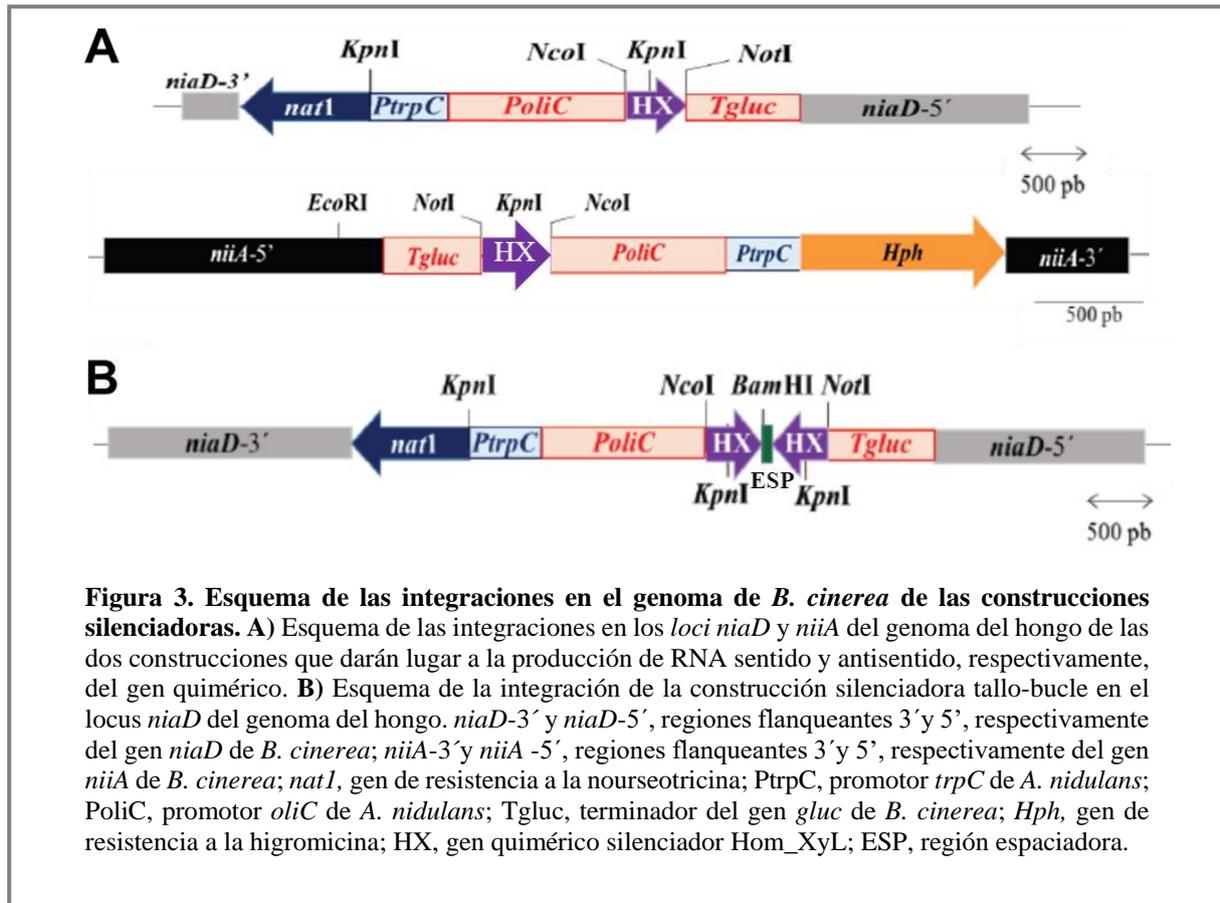


Figura 3. Esquema de las integraciones en el genoma de *B. cinerea* de las construcciones silenciadoras. A) Esquema de las integraciones en los loci *niaD* y *niiA* del genoma del hongo de las dos construcciones que darán lugar a la producción de RNA sentido y antisentido, respectivamente, del gen quimérico. B) Esquema de la integración de la construcción silenciadora tallo-bucle en el locus *niaD* del genoma del hongo. *niaD*-3' y *niaD*-5', regiones flanqueantes 3' y 5', respectivamente del gen *niaD* de *B. cinerea*; *niiA*-3' y *niiA*-5', regiones flanqueantes 3' y 5', respectivamente del gen *niiA* de *B. cinerea*; *nat1*, gen de resistencia a la nourseotricina; *PtpC*, promotor *trpC* de *A. nidulans*; *PoliC*, promotor *oliC* de *A. nidulans*; *Tgluc*, terminador del gen *gluc* de *B. cinerea*; *Hph*, gen de resistencia a la higromicina; *HX*, gen quimérico silenciador Hom_XyL; *ESP*, región espaciadora.

Por otro lado, la caracterización de las cepas silenciadas requiere de disponer de herramientas que permitan analizar el grado de silenciamiento que se ha conseguido de cada una de las xilanasas secretadas por el hongo. La PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR) se presenta como una alternativa válida para valorar los cambios de expresión a nivel de RNAm. Sin embargo, se debe disponer de otra herramienta para poder analizar cómo esos cambios se ven reflejados en la actividad de cada una de las enzimas en el secretoma del hongo. En la caracterización inicial de las cepas silenciadas, se utilizó la técnica del zimograma (García, 2015), consistente en fraccionar las proteínas del secretoma por electroforesis en geles de poliacrilamida suplementados con xilano. Después de un proceso de renaturalización, las bandas correspondientes a proteínas con actividad xilanasas se detectan en los geles por tinción negativa con rojo congo. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes ya que no se pudieron detectar todas las xilanasas en los secretomas de la cepa silvestre. Se hace necesario, por tanto, poner a modificar las condiciones experimentales de esta técnica para obtener mejores resultados.

OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo:

Poner a punto nuevas herramientas moleculares que permitan analizar el papel de las xilanasas secretadas por Botrytis cinerea en su virulencia

Para la consecución del mismo, se abordarán como objetivos específicos

1. Caracterizar *in silico* las cinco endo- β -1,4-xilanasas anotadas en el genoma del hongo *Botrytis cinerea* por medio de herramientas bioinformáticas.
2. Analizar distintas condiciones de crecimiento de *Botrytis cinerea* para inducir la expresión de las cinco xilanasas en los secretomas del hongo y su posterior detección y análisis *in vitro* por medio de la técnica del zimograma.
3. Valorar la eficacia de la técnica del silenciamiento por RNA en el silenciamiento de los cinco genes que codifican para endo- β -1,4-xilanasas de *Botrytis cinerea* y el grado de estabilidad de las cepas transformantes silenciadas obtenidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas

Para la búsqueda de las posibles regiones de interés en las secuencias de las xilanasas de la familia 10 y 11 codificadas por el genoma de *Botrytis cinerea*, identificadas en trabajos anteriores (García, 2014; García, 2015) se utilizaron las siguientes herramientas de bioinformática:

- **Pfam** (<http://pfam.xfam.org>) y **PROSITE** (<http://prosite.expasy.org/>): para la identificación de los posibles dominios.
- **SignalP 4.1** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>): para localizar una posible secuencia señal que vincule estas proteínas con la ruta de secreción del hongo.
- **ProtParam tool** (<http://web.expasy.org/protparam/>): para el cálculo y estimación del número de aminoácidos, el peso molecular, punto isoeléctrico, así como el índice alifático de la secuencia.
- **NetNGlyc 1.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y **NetOGlyc 4.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>): para la localización de posibles lugares de N-glicosilación y O-glicosilación, respectivamente.

2. Organismos

- *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) y considerada como cepa silvestre en el presente trabajo.

- *BcXylDT2-Hom* y *BcXylDT2-Het*: cepas derivadas de B05.10, en las que se ha integrado una copia del gen quimérico Homo_Xyl en el locus *niaD* y otra, en el locus *niiA* del genoma del hongo, de manera que se transcriben las dos cadenas del gen quimérico (García, 2015). Las terminaciones *-Hom* ó *-Het*, indican, respectivamente, el carácter homocariote y heterocariote de cada una de ellas.

- *BcXylT2.1-Hom* y *BcXylT2.1-Het*: cepas derivadas de B05.10, en las que se han integrado dos copias del gen quimérico Homo_Xyl en orientaciones invertidas en el locus *niaD* del hongo, de manera que se transcriben las dos cadenas del gen quimérico (García, 2015). Las terminaciones *-Hom* ó *-Het*, indican, respectivamente, el carácter homocariote y heterocariote de cada una de ellas.

Las cepas de *B. cinerea* fueron conservadas durante periodos de tiempo prolongados como conidias en glicerol al 15 %.

3. Medios de cultivo para el crecimiento de *Botrytis cinerea*

- **MEA (Malt Extract Agar):** Extracto de malta (Bacto malt extract, DIFCO) al 3 %, agar bacteriológico al 1,5 %. Este medio fue suplementado con 100 µg/ml de higromicina y/o nourseotricina, según se indica más adelante.
- **Tomate agar:** Extracto de frutos de tomate al 25 % (p/v) ajustado a pH 5,5 con NaOH, agar 1,5 %.
- **YGG:** Extracto de levadura (Yeast extract, Panreac) 0,5 %, glucosa 2 %, Gamborg B5 (Gamborg B5 Medium, Duchefa) al 0,3 %. Cuando fue necesario se suplementó con agar al 1,5%.
- **Czapek-Dox (CD):** medio mínimo compuesto KH_2PO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,002 %, KCl 0,05% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 %. Como fuentes de carbono se utilizó xilano (beechwood xylan, Sigma-Aldrich) 1% y 0,5%, y glucosa 2%.
- **Gamborg B5 + xilano (pH 5 y 6):** medios mínimos basados en Gamborg B5 (Gamborg B5 Medium, Duchefa) al 0,3 % con xilano 1% como fuente de carbono y tamponados a pH 5 con tampón citrato/cítrico 50 mM y a pH 6 con tampón fosfato 50 mM.

4. Aislamiento de conidias

Las conidias fueron utilizadas de forma rutinaria para establecer los cultivos del hongo y para la conservación de las cepas fúngicas a -80°C. Para su aislamiento se siguió el protocolo descrito por (Benito *et al.*, 1998), modificado en función del uso que se fuera a hacer de las conidias.

1. Sembrar placas de tomate o YGG agar sembradas con conidias, iluminar con luz cercana al ultravioleta al tercer día durante 12 horas, e incubar por 7 días más a 20°C.
2. 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 a 1500 x g durante 5 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender las conidias en 30 ml de agua y volver a recoger por centrifugación. Repetir este paso 2 veces.
5. Retirar el sobrenadante y resuspender las conidias en 500 µl de agua estéril.

6. Finalmente, cuantificar las conidias de una dilución 1/100 midiendo la absorbancia a 600 nm. La relación entre los valores de absorbancia y el número de conidias por mililitro se calcula con ayuda de un hemocitómetro.

5. Obtención de los secretomas de las cepas fúngicas

Las cepas B05.10, BcXylDT2-Hom, BcXylDT2-Het, BcXylT2.1-Hom y BcXylT2.1-Het fueron crecidas en medios suplementados con xilano como fuente de carbono, según se indica más adelante, con el fin de obtener los secretomas de cada una de ellas y valorar la presencia de las distintas xilanasas producidas por el hongo.

1. Obtener conidias de las cepas fúngicas por el procedimiento descrito más arriba (apartado 4.1)
2. Inocular 30 ml de medio CD ó Gamborg B5, según los casos, con una concentración de 10^6 conidias por mililitro.
3. Mantener en agitación a 20°C durante 12, 24, 48 o 72 horas, según los casos.
4. A los tiempos indicados, filtrar al vacío los cultivos a través de papel de filtro y congelar los filtrados a -20°C hasta su posterior uso.

6. Precipitación de proteínas

Para concentrar por precipitación las proteínas presentes en los secretomas producidos por las distintas cepas, se ensayaron los siguientes métodos de precipitación.

6.1. Precipitación con metanol-cloroformo

Protocolo adaptado de Wessel y Flüggé (Wessel y Flüggé, 1984).

1. Descongelar las muestras de los secretomas (entre 1,5 y 3 ml) y centrifugar 10 min a 15000 x g a 4°C.
2. Pasar el sobrenadante a nuevo tubo, añadir 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, agitando 5 seg antes añadir cada solvente.
3. Centrifugar en las mismas condiciones que en el paso 1 y retirar la fase acuosa con cuidado de no tocar la interfase.
4. Añadir 3 volúmenes de metanol, agitar de nuevo y centrifugar durante 15000 x g 10 min a 4°C.
5. Retirar casi todo el sobrenadante, con cuidado de no llevarse el pellet.
6. Resuspender con 3 de metanol y transferir a un tubo eppendorf.
7. Centrifugar durante 10 min a 15000 x g, retirar el sobrenadante y dejar secar.

6.2. Precipitación con acetona

1. Descongelar las muestras de los secretomas (entre 1,5 y 3 ml) y centrifugar 10 min a 15000 x g a 4°C.
2. Añadir 8 volúmenes de acetona previamente enfriada a -20°C y centrifugar 10 min a 15000 x g a 4°C.
3. Retirar casi todo el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml y resuspender el pellet en este volumen para transferir la suspensión a un nuevo tubo.
4. Centrifugar 5 min a 15000 x g a 4°C, retirar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente.

6.3. Precipitación con tricloroacético (TCA)

1. Descongelar las muestras de los secretomas (entre 1,5 y 3 ml) y centrifugar 10 min a 15000 x g a 4°C.
2. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo, añadir TCA al 6% e incubar 1 hora en hielo.
3. Centrifugar 10 min a 15000 x g y 4°C y eliminar con cuidado el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 0,5 ml de etanol 96%, traspasar a un eppendorf y volver a centrifugar como en 3. Repetir este paso 2 veces más.
5. Retirar el sobrenadante y secar el sedimento a temperatura ambiente.

6.4. Precipitación con tricloroacético y metanol-cloroformo

1. Realizar los pasos 1-5 siguiendo el anterior protocolo.
2. Resuspender en 150 µl de urea 8M, mezclar bien con vortex/ o bombear con el émbolo de la pipeta e incubar 10 min a temperatura ambiente, 10 min a 30°C y, por último, otros 10 min a temperatura ambiente
3. Añadir 4 volúmenes de etanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, agitando 5 seg antes de añadir cada solvente.
4. Centrifugar durante 10 min a 15000 x g y eliminar el sobrenadante con cuidado de no alterar la interfase en los tubos.
5. Añadir 3 volúmenes de metanol, agitar y centrifugar 10 min a 15000 x g.
6. Retirar sobrenadante y dejar secar pellet.

7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El fraccionamiento de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por medio de electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) basada en el método de Laemmli (Laemmli, 1970) y utilizando el sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad.

7.1. Preparación del gel de separación al 10%T

1. Mezclar 2,03 ml de agua, 1,67 ml de acrilamida/bisacrilamida 30%, 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 30 μ l de SDS 20%.
2. Desgasificar, añadir 30 μ l de persulfato amónico al 10% y 2,5 μ l de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina, Sigma-Aldrich).
3. Verter entre los dos vidrios del sistema Mini- Protean 3 de Bio-Rad y cubrir la superficie lentamente con 1-2 ml de agua.
4. Dejar polimerizar durante una hora.

7.2. Preparación del gel de compactación al 4%T

1. Mezclar 1,82 ml de agua, 0,40 ml de acrilamida/bisacrilamida 30%, 0,75 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y 15 μ l de SDS 20%.
2. Desgasificar, y añadir 15 μ l de persulfato amónico al 10% y 3 μ l de TEMED.
3. Verter sobre el gel de separación ya polimerizado, colocar el peine y dejar polimerizar durante 1 hora.
4. Retirar el peine y lavar los pocillos con tampón de cámara (Tris 25 mM, Glicina 0,2 M pH 8,3, SDS 0,1%).

7.3. Preparación de las muestras

1. Resuspender las proteínas precipitadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente en LSB 2x (SDS 2%, β -mercaptoetanol 1%, glicerol 15%, Tris-HCl 90 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,0025%).
2. Hervir a 95 °C. durante 5 min y centrifugar durante 5 min a 15000 x g y guardar el sobrenadante a -20°C hasta su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

7.4. Desarrollo de la electroforesis y tinción

1. Cargar las muestras en los pocillos de los geles de poliacrilamida y desarrollar la electroforesis con tampón de cámara a una diferencia de potencial de 150 V.
2. Teñir los geles con Coomassie coloidal (Neuhoff *et al.*, 1988), fijando primero las proteínas con una disolución etanol:acético:agua; 5:1:4 durante al menos una hora, y tiñendo seguidamente con Coomassie Brilliant blue G250 (Sigma-Aldrich) al 0,1% en una mezcla de ácido ortofosfórico 2%, sulfato amónico 10% y metanol 20%, durante toda una noche.
3. Estimar el tamaño de las proteínas comparando su patrón de migración con marcadores de tamaño conocido (Prestained SDS-Page Standar, Bio-Rad).

8. Zimograma

Para detectar las proteínas con actividad xilanas después de haber sido fraccionadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se modificó el protocolo descrito en el apartado anterior, de la siguiente manera.

1. Preparar el gel de separación incluyendo en su composición xilano al 0,1% (beechwood xylan, Sigma-Aldrich).
2. Fraccionar las proteínas siguiendo el apartado 7 de Material y Métodos.
3. Sumergir los geles durante 1 hora en Tritón X-100 al 2,5% y lavar varias veces con agua para eliminar los restos de Triton X-100.
4. Incubar el gel en tampón citrato 50 mM pH 5,4 durante 1 hora, a 25°C y lavar varias veces con agua.
5. Teñir sumergiendo los geles durante 15 minutos en una disolución de rojo congo al 0,1% y desteñir en NaCl 1M durante otros 15 minutos.
6. Repetir el paso anterior y desteñir en NaCl 1M hasta visualizar las bandas de hidrólisis.
7. Parar la reacción, sumergiendo los geles en ácido acético 0,5%.

9. Electroforesis en condiciones nativas

En este caso, la composición de los geles de separación y compactación fue la misma que la utilizada en los preparados para llevar a cabo un zimograma, pero se eliminó el SDS. También este detergente fue eliminado del tampón de cámara. Se desarrolló la electroforesis a una diferencia de potencial de 150 V y los geles fueron revelados según se describe en el apartado anterior.

10. Purificación de DNA genómico de *B. cinerea*

El DNA genómico de *B. cinerea* se extrajo a partir de micelio del hongo siguiendo el método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (González *et al.*, 2008), modificación del método clásico de preparación de DNA genómico de hongos de Möller *et al.* (Möller *et al.*, 1992) y que se describe a continuación.

1. Crecer el hongo en 20 ml de YGG durante 3 días en agitación a 20°C.
2. Recoger el micelio por filtración y transferir al menos 50 mg a un tubo eppendorf.
3. Añadir 300 µl de TES-S (Tris-HCl 100 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM) y bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro hasta alcanzar el menisco formado por el líquido.
4. Homogeneizar el micelio en un FastPrep-24MP BeadBeater a 6,5m/seg durante 30 seg.

5. Añadir otros 200 µl TES-S, 50µl de SDS al 20% y 1,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar 30 min a 60°C.
6. Agujerear el fondo del tubo con una aguja al rojo, colocar sobre otro tubo sin tapa y centrifugar 5 min a 8000 x g para recoger su contenido.
7. Añadir 194 µl de NaCl 5M y 69,4 µl de CTAB 10% (bromuro de cetiltrimetilammonio) e incubar la mezcla durante 10 min a 65°C.
8. Añadir 700 µl de SEVAG (cloroformo:isoamílico 24:1), mezclar suavemente (vortex 1 seg) e incubar durante 30 min a 0°C.
9. Centrifugar 10 min a 4°C a 15000 x g y transferir 650 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo.
10. Añadir 325 µl acetato amónico 5M, mezclar suavemente y congelar a -70°C al menos 30 min.
11. Dejar descongelar y centrifugar 10 min a 4°C a 15000 x g.
12. Transferir 900 µl del sobrenadante a un tubo nuevo e incubar con RNAsa (2µl RNAsa (Roche, IN, U.S.A.) 10 mg/ml en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM.), durante 15 min a 37°C.
13. Añadir 0,55 vol de isopropanol para precipitar el DNA, mezclar invirtiendo el tubo varias veces y centrifugar inmediatamente durante 10 min a 15000 x g.
14. Decantar el sobrenadante con cuidado y lavar el DNA sedimentado 2 veces con etanol al 70%.
15. Retirar con cuidado todos los restos de etanol, secar y resuspender el DNA en 100 µl de agua estéril.

11. Reacciones de PCR

En las reacciones de amplificación a partir de DNA genómico de *B. cinerea*, se utilizó de manera rutinaria la polimerasa *Taq* (GenScript), siguiendo la pauta que se detalla en la **Tabla 2** y con los cebadores que se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en las reacciones de PCR

		Parejas de cebadores			
		Xyl-FW / Xyl-RV		EndOliC-FW / PpcTGluc-RV	
Nº de ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Duración (segundos)	Temperatura (°C)	Duración (segundos)
1 x	Desnaturalización	95	30	95	30
10x	Desnaturalización	95	15	95	15
	Anillamiento	54	30	46	30
	Extensión	68	30	68	45
20x	Desnaturalización	95	15	95	15
	Anillamiento	54	30	54	30
	Extensión	68	30 + 1 extra en cada ciclo	68	45 + 1 extra en cada ciclo
1x	Extensión extra	68	10 min	68	10 min
1 x		18	indefinido	18	indefinido

Tabla 3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo

Cebadores	Secuencia (5' →3')
Xyl-FW	TCTTCACAATGGTTTCTGCATC
Xyl-RV	TTAAGAAACAGTGATGGAAGCG
EndOliC-FW	TTCCCATCATCCATCTCC
PpcTGluc-RV	TTCCTCAGCCATAATCCTTC

12. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para estimar la cantidad de plásmido presente en las muestras, es necesario llevar a cabo una electroforesis de las mismas. Las muestras se mezclaron con 1/10 de tampón de carga 10x (azul de bromofenol al 0,25%, EDTA 10 mM, sacarosa al 40%) y se fraccionaron en geles de agarosa a una concentración del 0,7% (p/v), utilizando tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 0,05 M) como tampón de cámara. Las electroforesis se realizaron a una diferencia de potencial de 100 V y las bandas de DNA se visualizaron con GelRed (Biotium). El tamaño de los fragmentos de ADN se determinó comparando su patrón de migración con la de marcadores de tamaño conocido (DNA Molecular Weight Marker XVII, para fragmentos superiores a 500 pb, ó X, para fragmentos de ADN inferiores a este tamaño (Roche, IN, U.S.A.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis bioinformático de las endo- β -1,4-xilanasas de la familia 10 y 11 secretadas por el hongo *B. cinerea*

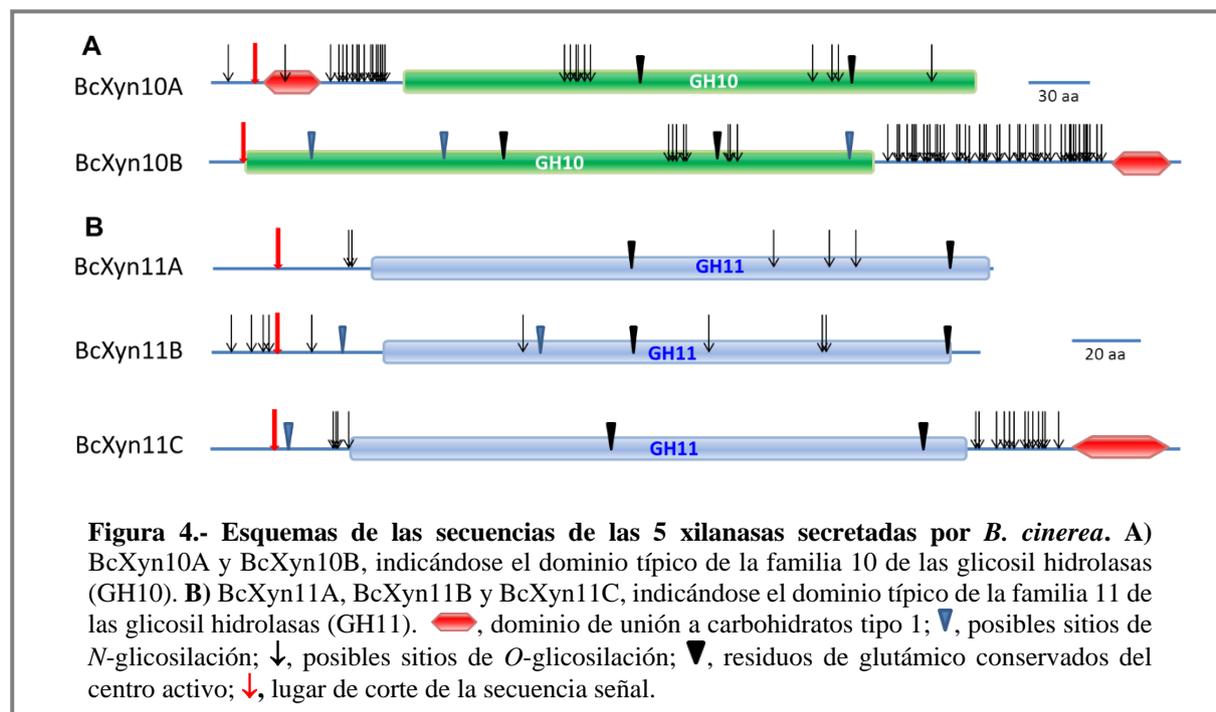
En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se analizó el índice de conservación de cada uno de los residuos de aminoácidos de cada una de las secuencias de las 5 xilanasas secretadas por *B. cinerea*, encontrándose en las enzimas de las dos familias cuatro regiones muy conservadas, todas ellas probablemente formando parte del centro activo o próximas a este (García, 2015). En el presente trabajo se decidió analizar con más detalle las posibles regiones funcionales conservadas en las 5 enzimas.

El análisis de las 5 secuencias con los servidores *Pfam* y *Prosite* permitió localizar los dominios característicos de las familias GH10 (PF00734) y GH11 (PF00457), según el servidor *Pfam*, que contienen los dos residuos de glutámico conservados del centro activo (**Fig. 4**) y característicos de las proteínas pertenecientes a estas dos familias (Collins *et al.*, 2005). En las dos xilanasas de la familia GH10 y en BcXyn11C, se identificaron sendos dominios de unión a carbohidratos (PF00734) (**Fig. 4**). En los tres casos, estos dominios de unión se identificaron como típicos de la familia 1, que se caracterizan por agrupar dominios de 36 aminoácidos y con 4 residuos de cisteína conservados.

Sólo BcXyn11A ha sido identificada experimentalmente en el secretoma de *B. cinerea* (Espino *et al.*, 2010), por lo que se analizó el resto de las secuencias con el servidor *SignalP 4.1* para identificar posibles secuencias señal, responsables del envío de cada una de ellas a la ruta de secreción. En todos los casos, se predice una secuencia señal típica, de entre 17 residuos de aminoácidos en el caso de BcXyn10B y 22 residuos, en el caso de BcXyn10A (**Fig. 4**).

Además, se han identificado los posibles sitios de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación, utilizando los servidores *NetNGlyc 1.0* y *NetOGlyc 4.1*, respectivamente, en las cinco xilanasas. En todas las proteínas, salvo en BcXyn10B y BcXyn11A, se predice al menos un posible lugar de *N*-glicosilación, siendo BcXyn10A en la que se predice un mayor número de ellos. Los posibles lugares de *O*-glicosilación fueron mucho más numerosos en las 3 enzimas que contienen un dominio de unión a carbohidratos, concentrándose la mayor parte de estos lugares en la región bisagra que conecta el dominio de unión a carbohidratos con el catalítico (**Fig. 4**). Así, en BcXyn10A y BcXyn10B, el número de posibles *O*-glicosilaciones osciló entre 27 y 55,

respectivamente, mientras que entre las enzimas de la familia 11, BcXyn11C fue la proteína en la que se predicen mayor número de este tipo de glicosilaciones (17 sitios).



La presencia de estos dominios de unión a carbohidratos ha sido descrita en numerosas xilanasas, tanto de la familia 10 como de la familia 11 (Ali *et al.*, 2001; Anbarasan *et al.*, 2010; Leskinen *et al.*, 2005; Meissner *et al.*, 2000), y su papel parece estar relacionado con la interacción con el sustrato, facilitando su degradación. También, la presencia de gran cantidad de residuos O-glicosilados en la región que conecta este dominio con el dominio catalítico se ha descrito en numerosas xilanasas y se ha relacionado con un posible papel en la protección frente a proteasas y, más recientemente, en la unión del sustrato a la enzima (Anbarasan *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2013).

Por otra parte, se utilizó el servidor *Protparam* para obtener información sobre parámetros físico-químicos de cada una de las enzimas, tales como el peso molecular, el punto isoeléctrico o el índice alifático. En la **Tabla 4**, se recogen los datos estimados para las cinco proteínas, tanto para las secuencias proteicas con sus secuencias señal como para las proteínas maduras, una vez han sido procesadas y se ha eliminado la secuencia señal. Como era de esperar, para las dos xilanasas de la familia 10 se predice un tamaño que casi llega casi a duplicar al peso molecular de las xilanasas de la familia 11. Al analizar los valores de los puntos isoeléctricos, 2 de las xilanasas maduras presentan pI básicos (BcXyn10A y BcXyn11A), mientras que para las 3 restantes se predicen pI que oscilan entre 5,76 y 4,51. Destaca en este aspecto, el cambio significativo que se produce en el valor del pI de BcXyn11C, que de 7,49

como pre-proteína, pasa a 5,76 en la proteína madura. También se estimó el índice alifático para cada una de las secuencias (**Tabla 4**), que se define como el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas de los residuos alanina, valina, isoleucina y leucina, y que está relacionado con la termoestabilidad de las proteínas globulares (Ikai, 1980) y, por tanto, con su solubilidad (Idicula-Thomas y Balaji, 2005). En todos los casos, los valores del índice alifático de las 5 xilanasas fueron altos, sugiriendo que todas ellas serían proteínas solubles en el medio extracelular.

Tabla 4. Predicción de distintos parámetros físicos y químicos de las 5 xilanasas secretadas por *B. cinerea*. El servidor utilizado fue *ProtParam*. Se realizaron predicciones para las proteínas con secuencia señal y para las proteínas maduras sin secuencia señal.

	Con secuencia señal				Proteína madura			
	Nº aa ^a	PM (Da) ^b	pI ^c	IA ^d	Nº aa ^a	PM (Da) ^b	pI ^c	IA ^d
BcXyn10A	388	40944	7,02	81,06	366	38675	7,13	76,83
BcXyn10B	487	51274	4,96	85,56	470	49452	4,88	82,43
BcXyn11A	227	23824	7,80	65,77	208	22046	8,04	59,09
BcXyn11B	222	23761	4,51	75,90	203	21789	4,51	70,99
BcXyn11C	281	29435	7,49	50,68	262	27355	5,76	43,93

^a Número de residuos de aminoácidos. ^b Peso molecular en daltons. ^c Punto isoeléctrico. ^d Índice alifático

Estos datos serán útiles para la identificación de las xilanasas en los zimogramas de los secretomas de las distintas cepas de *Botrytis* estudiadas en este trabajo. Se debe tener en cuenta, que el alto grado de glicosilación de alguna de ellas podría modificar notablemente el peso molecular aparente y, por tanto, su localización en los geles de acrilamida.

2. Optimización de la detección por zimograma de las xilanasas secretadas por *B. cinerea*

Antes de llevar a cabo el análisis de la actividad xilanasas, primero se buscó determinar qué método de precipitación es el más adecuado para obtener mayor cantidad de proteínas totales a partir de los secretomas del hongo.

Para ello, se creció la cepa silvestre B05.10 en medio CD suplementado con xilano al 1% durante 72h y alícuotas de 3 ml del sobrenadante del cultivo fueron precipitadas siguiendo distintos solventes orgánicos: precipitación con metanol-cloroformo, con acetona, con tricloroacético y realizando una doble precipitación con tricloroacético y metanol-cloroformo. Las proteínas precipitadas fueron fraccionadas por electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS y fueron detectadas en los geles por tinción con azul de coomassie coloidal.

Los resultados mostraron que el rendimiento en todos los casos fue muy bajo, destacando la precipitación con metanol-cloroformo como la técnica ligeramente más eficaz y el uso de acetona como la que mayor pérdida de proteínas provocó (**Fig. 5A**). Posiblemente, la razón del bajo rendimiento obtenido en todos los casos sea la gran cantidad de polisacáridos que *B. cinerea* secreta durante su crecimiento (Manteau et al., 2003; Stahmann et al., 1995) y que, en la mayoría de las ocasiones, co-precipitan con las proteínas en los protocolos ensayados. De hecho, las muestras que se cargaban en los pocillos de los geles de electroforesis eran muy viscosas, haciendo muy difícil su manipulación.

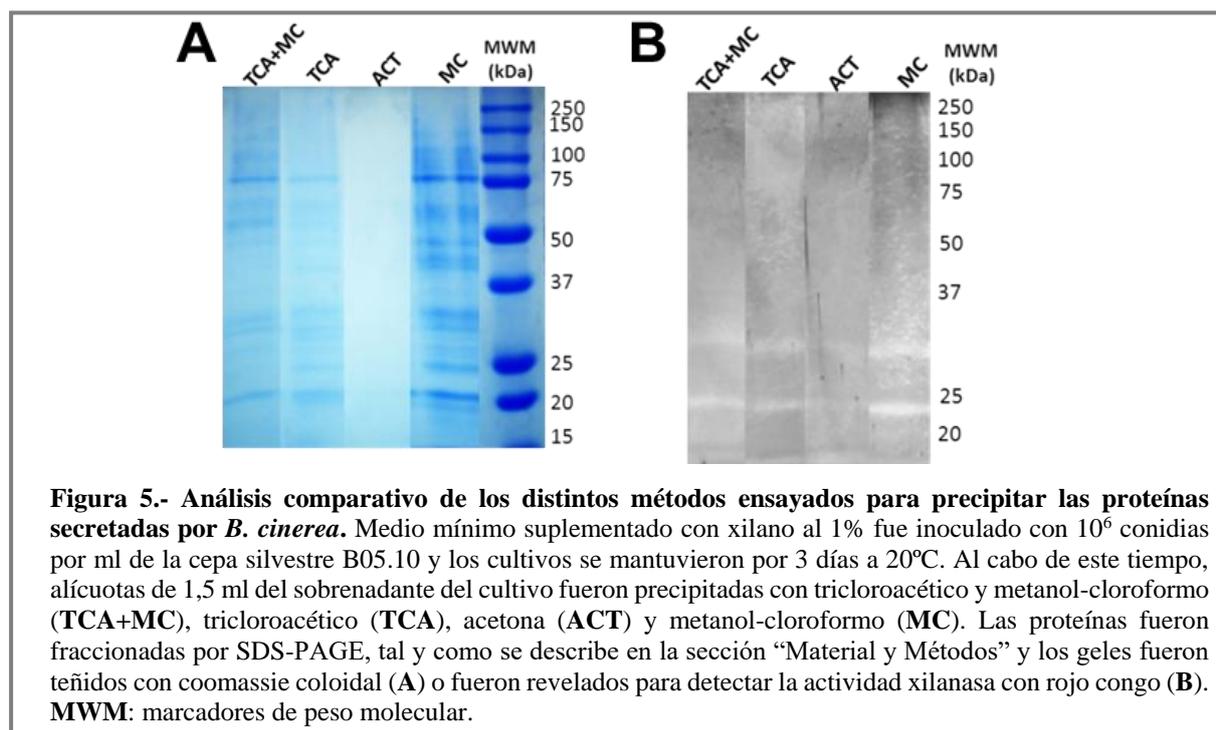


Figura 5.- Análisis comparativo de los distintos métodos ensayados para precipitar las proteínas secretadas por *B. cinerea*. Medio mínimo suplementado con xilano al 1% fue inoculado con 10^6 conidias por ml de la cepa silvestre B05.10 y los cultivos se mantuvieron por 3 días a 20°C. Al cabo de este tiempo, alícuotas de 1,5 ml del sobrenadante del cultivo fueron precipitadas con tricloroacético y metanol-cloroformo (TCA+MC), tricloroacético (TCA), acetona (ACT) y metanol-cloroformo (MC). Las proteínas fueron fraccionadas por SDS-PAGE, tal y como se describe en la sección “Material y Métodos” y los geles fueron teñidos con coomassie coloidal (A) o fueron revelados para detectar la actividad xilanasas con rojo congo (B). MWM: marcadores de peso molecular.

El mejor rendimiento del uso de metanol-cloroformo como método de precipitación de las proteínas secretadas por *B. cinerea*, también ha sido descrito en la precipitación de los secretomas de *Aspergillus fumigatus* (Srivastava A K, 2015). Por otro lado, la precipitación, por ejemplo, de las proteínas del plasma humano, ha sido más eficiente con tricloroacético y acetona (Jiang et al., 2004). Recientemente, se ha publicado un estudio comparativo de distintos protocolos de extracción y precipitación de proteínas a partir de diferentes tejidos de *Cajanus cajan*, una leguminosa arbustiva, concluyendo que la eficacia de estos métodos depende estrictamente de los constituyentes metabólicos de los tejidos (Singh et al., 2015).

Por otro lado, también se valoró si con los 4 métodos de precipitación ensayados se podía recuperar con la misma eficacia la actividad enzimática de las xilanasas cuando las proteínas precipitadas eran fraccionadas por electroforesis desnaturizante y renaturalizadas en los geles por incubación con Triton X-100, para llevar a cabo la técnica del zimograma (**Fig.**

5B). En todos los casos, salvo en las muestras obtenidas por precipitación con acetona, se observaron dos únicas bandas de hidrólisis del xilano, que corresponderían aproximadamente, con proteínas de 31 y 24 kDa, respectivamente. De nuevo, la intensidad de las zonas de hidrólisis del sustrato fue ligeramente más intensa en el caso de las proteínas obtenidas por precipitación con metanol-cloroformo. Tal y como se recoge en el apartado anterior, los pesos moleculares estimados para las xilanasas maduras fueron de 38,6, 49,4, 22, 21,7 y 27,3 respectivamente para BcXyn10A, BcXyn10B, BcXyn11A, BcXyn11B y BcXyn11C, por lo que las dos bandas de hidrólisis podrían corresponder a BcXyn11C y BcXyn11A, respectivamente. Estas dos proteínas pertenecen a la familia 11 de las glicosilhidrolasas, sus pI son muy dispares (5,7 para la primera y 8,04 para la segunda) y sólo una de ellas contiene un dominio de unión a carbohidratos en su secuencia. El hecho de que sólo se detecte actividad para ambas proteínas no se debe, por tanto, a características comunes que el resto de las xilanasas carezcan.

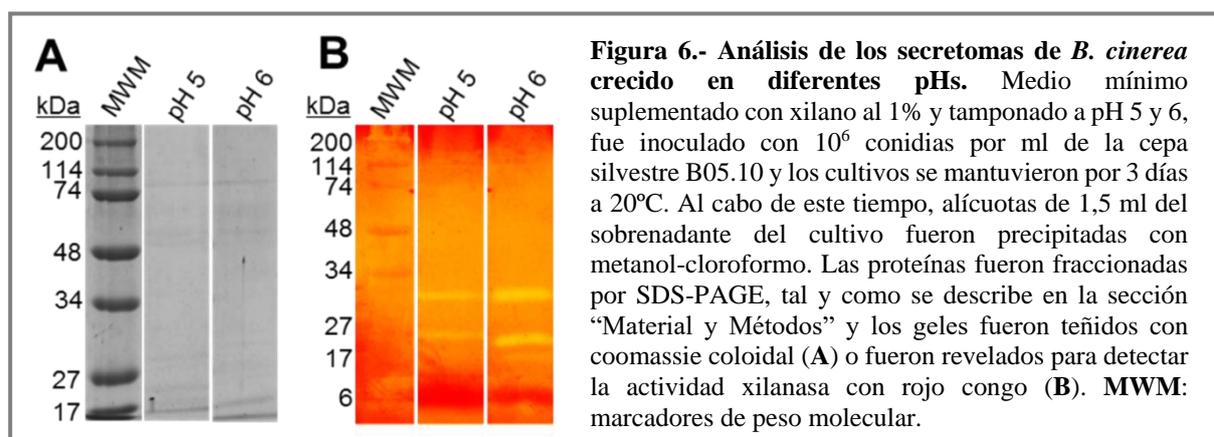
Ante los resultados obtenidos, se decidió modificar las condiciones del zimograma con la esperanza de que estos cambios permitieran detectar mayor número de xilanasas en los geles. En este caso, una vez fraccionadas las proteínas por SDS-PAGE, los geles fueron incubados 3 horas en Triton X-100 al 2,5% y 24 horas en tampón citrato con el objetivo de introducir cambios significativos en las condiciones de renaturalización de las proteínas. Sin embargo, al teñir con rojo congo no se observó ninguna banda de hidrólisis (datos no mostrados). Se decidió entonces fraccionar las proteínas por electroforesis en condiciones nativas, tal y como se describe en “Material y Métodos”, pero tampoco en este caso se pudo mejorar los resultados conseguidos previamente (datos nos mostrados).

La ausencia en los geles de las zonas correspondientes a las dos xilanasas de la familia 10 pudiera deberse a que, o bien la concentración de estas proteínas en los sobrenadantes es muy baja, o que el paso de renaturalización no es el adecuado para este tipo de proteínas y no llegan a ser activas. Sin embargo, xilanasas de esta misma familia secretadas por *Penicillium oxalicum* GZ-2 (Liao et al., 2015) o *Aspergillus nidulans* (Ribeiro et al., 2014) han sido detectadas en los geles siguiendo protocolos similares al utilizado en el presente trabajo. Por todo ello, la primera hipótesis, es decir, la baja concentración de estas proteínas en los sobrenadantes de los cultivos de *B. cinerea*, podría ser la causa de que no se detecten en los zimogramas. Se decidió, entonces, modificar las condiciones de cultivo del hongo con el fin de intentar inducir una mayor expresión de estas proteínas por el hongo.

3. Optimización de las condiciones de crecimiento de *B. cinerea*

3.1. Valoración del efecto del pH del medio en la secreción de las xilanasas de *B. cinerea*

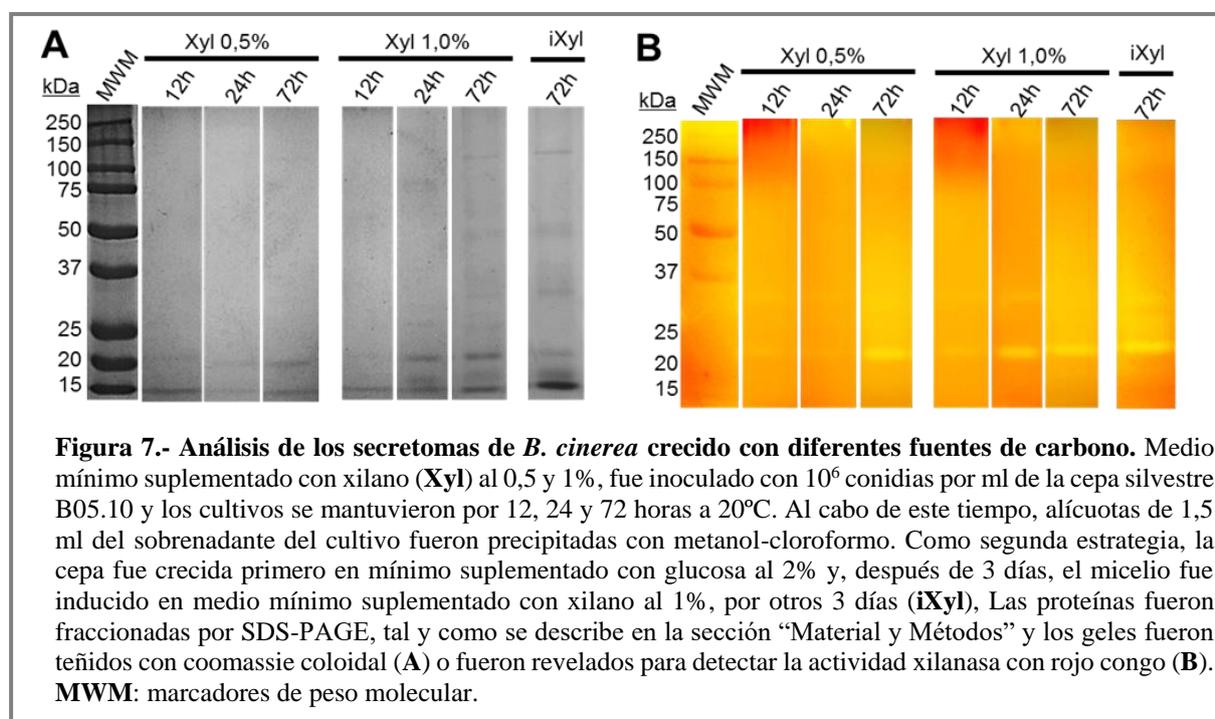
En esta ocasión, la cepa silvestre fue crecida en Gamborg B5 suplementado con xilano al 1%, pero se tamponó el medio a pH 5 con tampón citrato/cítrico 50 mM y a pH 6 con tampón fosfato 50 mM. Las conidias fueron germinadas durante 3 días y alícuotas de 1,5 ml de los sobrenadantes fueron tratadas con metanol-cloroformo y las proteínas precipitadas fueron fraccionadas por SDS-PAGE. De nuevo el rendimiento al precipitar proteínas no fue demasiado alto (**Fig. 6A**), pero se cuantificaron las proteínas totales en cada muestra y se cargaron cantidades similares en un nuevo gel para llevar a cabo el zimograma y revelar la actividad xilanasas en los geles (**Fig. 6B**). Las bandas de hidrólisis del xilano obtenidas, tanto para las muestras procedentes de los medios tamponados a pH 5 como a pH 6, fueron similares (**Fig. 6B**) entre sí y similares a las obtenidas cuando el hongo se creció en medio sin tamponar (**Fig. 5B**).



El pH del medio, es uno de los parámetros ambientales más importantes, que puede regular la expresión de las proteínas secretadas por varios hongos patógenos. *Botrytis cinerea* es capaz de ajustar la composición de su secretoma en respuesta a diferentes valores de pH del medio (González-Fernández et al., 2015; Li et al., 2012). De hecho, se ha descrito un aumento considerable de la expresión de las proteínas implicadas en la degradación de la pared a pH 6 (Li et al., 2012). Sin embargo, en el presente trabajo, modulando el pH a 5 y 6 en los medios suplementados con xilano no se pudo conseguir visualizar un mayor número de bandas de hidrólisis del sustrato en los geles de poliacrilamida, por lo que se decidió modificar en los medios la fuente de carbono.

3.2. Valoración del efecto de la fuente de carbono del medio en la secreción de las xilanasas de *B. cinerea*

La cepa silvestre fue crecida en medio CD suplementada con xilano al 1% y al 0,5%, las muestras de los sobrenadantes se recogieron a las 12, 24 y 72h después de la inoculación y fueron tratadas tal y como se describe en el apartado anterior (**Fig. 7**). Como segunda estrategia, se decidió germinar las conidias por 3 días en CD suplementado con glucosa al 2% y después de recoger el micelio, se resuspendió en CD esta vez suplementado con xilano al 1% y se mantuvo por otros 3 días a 20°C y con agitación. De nuevo se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se analizaron por SDS-PAGE y zimograma (**Fig. 7**).

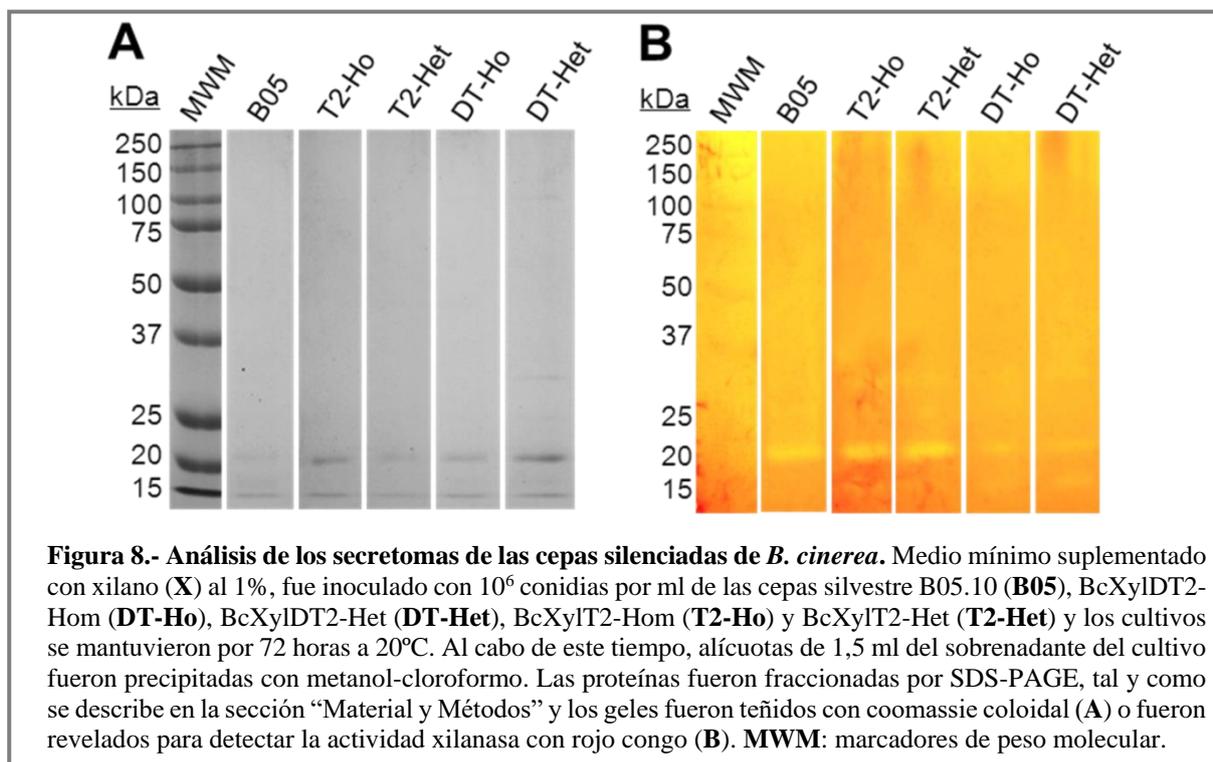


Los resultados mostraron que el perfil de bandas de hidrólisis de xilano en los zimogramas no se vio modificado al cambiar las condiciones de crecimiento del hongo con respecto a la fuente de carbono presente en el medio. Si se aprecia, sin embargo, una mayor intensidad de las bandas de hidrólisis a lo largo del tiempo, incrementándose desde las 12 hasta las 72 horas de cultivo (**Fig. 7**). La germinación y crecimiento previo del micelio en glucosa y la posterior inducción con xilano al 1% durante 3 días, tampoco produjo ningún cambio en el patrón de bandas de hidrólisis en los geles, pero sí se detectó una ligera disminución en la intensidad de las mismas (**Fig. 7**). Ante los resultados obtenidos, tanto modificando el pH como la fuente de carbono en los medios de cultivo de *B. cinerea*, se decidió elegir el crecimiento en CD suplementado con xilano al 1% como el mejor medio de los ensayados para valorar las diferencias entre las cepas silenciadas y la silvestre.

4. Análisis de los secretomas de las cepas silenciadas

La gran redundancia detectada entre las proteínas secretadas por *B. cinerea* (van Kan, 2006), (Espino et al., 2010; García, 2014; Kars et al., 2005) ha obligado a buscar estrategias alternativas para poder valorar el papel de ciertas proteínas en el ciclo de vida y virulencia del hongo. En nuestro laboratorio, se ha iniciado una línea de investigación centrada en conseguir cepas silenciadas para las 5 endo- β -1,4-xilanasas que secreta el hongo a los medios de cultivo (García, 2015). En la actualidad se dispone ya de cepas transformantes en las que se ha integrado en el genoma un gen quimérico cuya transcripción daría lugar a la formación de ARNdc específicos para cada uno de los 5 genes, que provocarían el silenciamiento por RNA, en mayor o menor medida, de todos ellos. Los transformantes inicialmente obtenidos fueron todos heterocariontes, es decir, todos ellos contenían una mezcla de núcleos transformados con la construcción silenciadora y de núcleos silvestres. Por resiembras sucesivas en medio selectivo y aislamiento de conidias puras, se logró obtener homocariontes de todos ellos, es decir, cepas en la que la totalidad de sus núcleos contenían la construcción silenciadora (García, 2015). Sin embargo, ha surgido la cuestión de si, en las cepas heterocariontes, la síntesis del ARNdc por alguno de los núcleos transformados podría ser suficiente para provocar la degradación de los ARNm.

Por ello, en el presente trabajo se analizaron los secretomas de las cepas silenciadas BcXylDT2 y BcXylT2.1, tanto homocariontes como heterocariontes (-Hom y -Het, respectivamente) cuando fueron crecidas en medio mínimo suplementado con xilano al 1% durante 3 días (**Fig. 8**). Las proteínas obtenidas tras la precipitación con metanol-cloroformo fueron cuantificadas por SDS-PAGE (**Fig. 8A**) y se desarrollaron nuevas electroforesis en geles suplementados con xilano igualando las cantidades de proteínas de todas las muestras, para detectar las proteínas con actividad xilanasas (**Fig. 8B**). Al revelar el zimograma se observó que en ninguna de las cepas silenciadas se consiguió eliminar completamente la actividad xilanasas en los sobrenadantes, ni siquiera en las cepas homocariontes (**Fig. 8B**). Sin embargo, en las cepas BcXylDT2 si se observó una disminución considerable de la zona de hidrólisis con respecto a la detectada en la cepa silvestre B05.10, que supuso una reducción del 50%, tanto en la cepa homocarionte como en el heterocarionte. La cepa BcXylT2 homocarionte, por el contrario, sólo mostró una reducción en la zona de hidrólisis que no alcanzó el 20% respecto a la cepa silvestre, mientras que la cepa heterocarionte mostró una capacidad de hidrolizar el xilano similar a la de la cepa B05.10.



Es muy común que en los ensayos de silenciamiento el grado de reducción de la expresión del gen diana sea muy variable entre las cepas transformantes (Patel et al., 2008; Patel et al., 2010) y además, el grado de silenciamiento que se consigue también se ve influenciado por la estrategia que se ha seguido para inducir la síntesis de ARNdc en el hongo (Espino et al., 2014). Los resultados que se han obtenido en el presente trabajo, si bien es cierto que no son del todo concluyentes porque en los zimogramas el número de bandas de hidrólisis no corresponde al número de posibles endo- β -1,4-xilanasas secretadas por el hongo, también confirman estas discrepancias en la eficacia de la técnica del silenciamiento dependiendo de la estrategia utilizada. En el caso de las cepas homocariontes BcXylDT2 y BcXylT2, el grado de silenciamiento conseguido oscila entre un 50% en la primera y un 14% en la segunda. Las estrategias que se han empleado en los dos casos para inducir la síntesis de ARNdc son totalmente distintas (Fig. 3): en las cepas BcXylDT2 se ha empleado la estrategia conocida como “sentido-antisentido”, mientras que en las cepas BcXylT2 se ha utilizado la estrategia “tallo-bucle”. Por otro lado, las cepas heterocariontes que se han ensayado de cada una de las estrategias (Fig. 8) tampoco se comportan de la misma manera. Los resultados obtenidos apuntan a que, dependiendo también de la estrategia silenciadora que se utilice y probablemente de su eficacia para producir el silenciamiento génico, se sigue haciendo necesario el aislamiento de cepas homocariontes.

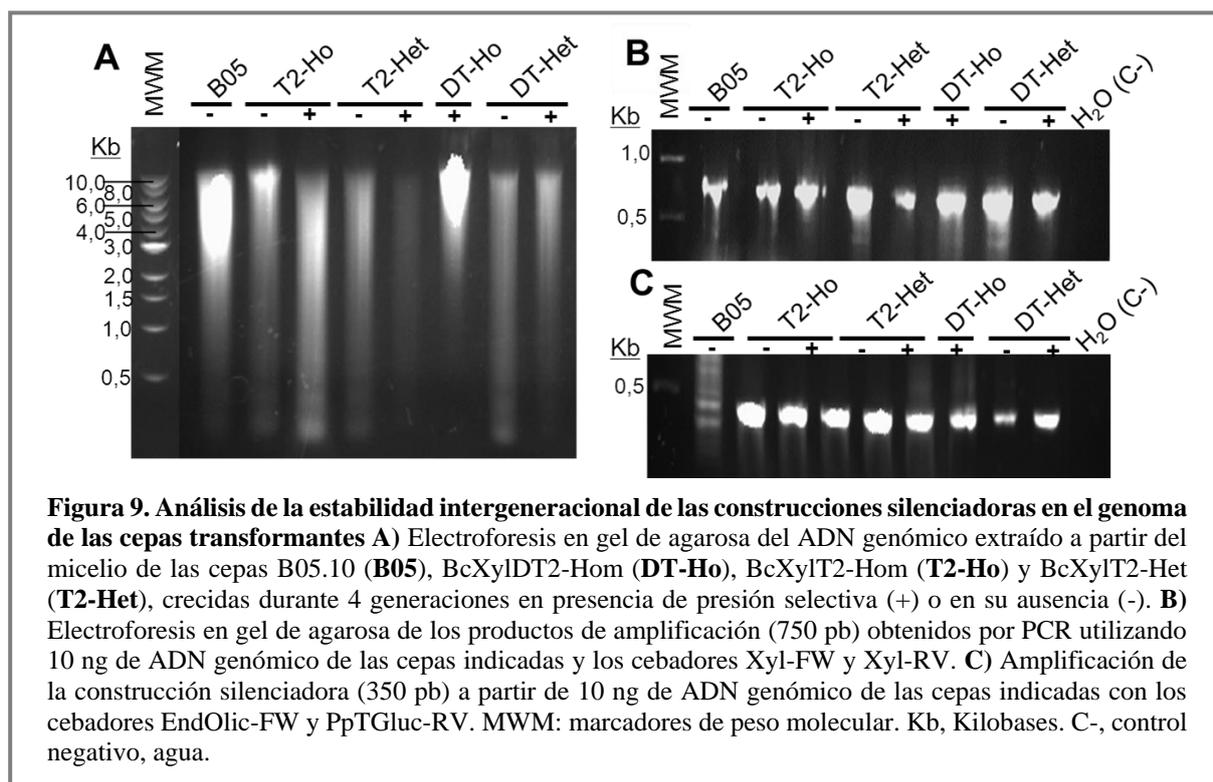
5. Análisis de la estabilidad de las construcciones silenciadoras en las cepas transformantes

Como se ha indicado anteriormente, el aislamiento de cepas homocariontes de *B. cinerea* requiere de una metodología compleja y laboriosa, que es insalvable en el caso de obtención de cepas mutantes *knockout*. Sin embargo, para que ocurra el silenciamiento mediado por ARNdc, podría bastar con que un solo núcleo diera lugar al ARNdc, de manera que la maquinaria de silenciamiento podría llevar a cabo este proceso. Por otra parte, la estabilidad intergeneracional de la construcción silenciadora en el genoma del hongo sí que podría suponer un problema en el caso de cepas heterocariontes, ya que *B. cinerea* se dispersa mediante esporas asexuales producidas mediante mitosis, que en última instancia derivan de un solo núcleo. Por lo tanto, estadísticamente existe un cierto riesgo de que, tras cada generación de conidias producidas en ausencia de presión selectiva, una cierta proporción de ellas no contenga la construcción silenciadora. Sin embargo, este fenómeno no puede ocurrir en el caso de cepas homocariontes, ya que todos los núcleos contienen el ADN transformante en su genoma.

Para analizar la estabilidad intergeneracional de las construcciones silenciadoras en el genoma de las cepas transformantes, se seleccionaron dos cepas homocariontes (BcXylT2.1-Hom y BcXylDT2-Hom), así como sus respectivas cepas heterocariontes (BcXylT2.1-Het y BcXylDT2-Het) y la cepa silvestre (B05.10). Las cinco cepas fueron crecidas o bien en medio YGG sólido, o bien en el mismo medio suplementado con los antibióticos necesarios para mantener la presión selectiva. Tras 7 días de cultivo, se purificaron conidias de cada una de las cepas, obteniéndose una primera generación de conidias. El proceso se repitió tres veces más, hasta obtener las conidias de cuarta generación. Estas conidias se utilizaron para inocular nuevos cultivos en medio líquido YGG, que se incubaron durante 5 días para así obtener micelio de cada cepa. Finalmente, los cultivos fueron filtrados para recoger el micelio, y se llevó a cabo el protocolo de purificación de DNA genómico. Para confirmar la presencia de ADN genómico en las muestras, se desarrolló una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) (**Fig. 9A**).

Los resultados muestran que, en todos los casos, se obtuvo gran cantidad de ADN genómico, que osciló entre 2 y 20 μg totales en las diferentes cepas. Sin embargo, la calidad del mismo no fue especialmente buena, lo que se puede apreciar como un rastro en el gel debido a la degradación del ADN cromosómico. Este efecto de degradación se debe posiblemente a unas condiciones de homogeneización del micelio demasiado agresivas, y a la presencia de gran cantidad de polisacáridos que produce *B. cinerea* y que son co-purificados comúnmente junto con el DNA genómico (**Fig. 9A**).

Para determinar si el ADN genómico presentaba una calidad suficiente para poder ser utilizado como molde en reacciones de PCR, en primer lugar se amplificó una región de 750 pb del gen *xyn11a*, que está presente en todas las cepas, utilizando los cebadores Xyl-FW y Xyl-RV, y 10 ng de ADN genómico como molde. Los resultados muestran que en todos los casos se observó el producto de amplificación de 750 pb (**Fig. 9B**), lo que indica que el DNA genómico presenta suficiente calidad para que pueda ser utilizado como molde en reacciones de PCR. Por lo tanto, se procedió a comprobar si las cepas mantienen la construcción silenciadora integrada en el genoma tras cuatro generaciones con o sin presión selectiva. Para ello, se llevó a cabo una PCR con los cebadores EndOlic-FW y PpTGluc-RV, que amplifican un fragmento de 350 pb correspondiente a la construcción silenciadora Hom_Xyl. Como control positivo de la amplificación se utilizó el plásmido pNDN-XYL, que contiene la construcción silenciadora (**Fig. 2 y 3**). En todos los casos se observó amplificación del producto esperado (**Fig. 9C**), lo que indica que la construcción silenciadora se mantiene en el genoma de las cepas heterocariontes incluso tras cuatro generaciones sin presión selectiva.



Estos resultados son de gran utilidad para el futuro, ya que, dependiendo de la estrategia silenciadora utilizada, se podría utilizar las cepas heterocariontes, al menos para abordar su análisis fenotípico en cultivo axénico, sin presión selectiva y sin riesgo a que se produzca la pérdida de la construcción silenciadora.

CONCLUSIONES

1. Las cinco enzimas anotadas en el genoma de *Botrytis cinerea* como endo- β -1,4-xilanasas son proteínas integradas en la vía de secreción del hongo, y cuyos pesos moleculares estimados oscilan entre los 50 y 22 kilodaltons, siendo las dos xilanasas de la familia GH10 las de mayor tamaño.
2. En las xilanasas BcXyn10A, BcXyn10B y BcXyn11C se ha identificado un posible dominio de unión a carbohidratos, unido al dominio catalítico por una región muy rica en residuos *O*-glicosilados que posiblemente participa también en la interacción con el sustrato y afecta al peso molecular aparente de estas tres enzimas.
3. La precipitación de las proteínas de los secretomas del hongo crecido en medio mínimo suplementado con xilano al 1% fue más eficaz utilizando el método del metanol-cloroformo, pudiéndose identificar al menos dos xilanasas de la familia 11 utilizando la técnica del zimograma.
4. El silenciamiento por RNA de las xilanasas producidas por *Botrytis cinerea* se presenta como una técnica que da lugar a cepas silenciadas genotípicamente estables y que requiere del aislamiento de cepas homocariontes dependiendo del tipo de estrategia silenciadora utilizada.

CONCLUSIONS

1. The five enzymes annotated in the *Botrytis cinerea* genome as endo- β -1,4-xylanases are integrated into the fungal secretory pathway, and their estimated molecular weights range between 50 and 22 kilodaltons, being the two GH10 family xylanases the larger ones.
2. A potential carbohydrate binding domain has been identified in BcXyn10A, BcXyn10B and BcXyn11C xylanases, attached to the catalytic domain by a region rich in *O*-glycosylated residues, possibly involved in the interaction with the substrate and affecting the apparent molecular weight of these three enzymes.
3. Precipitation of proteins contained in the secretome of the fungus grown in minimal medium supplemented with 1% xylan was more effective using the methanol-chloroform protocol and allowed to identify at least two family 11 xylanases using the zymogram approach.
4. The silencing of *Botrytis cinerea* xylanases appears as a technique which results in genotypically stable silenced strains and requires isolation of homokaryotic strains depending on the strategy used to induce the RNA silencing.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M. K., Hayashi, H., Karita, S., Goto, M., Kimura, T., Sakka, K. y Ohmiya, K. 2001. Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercorarium* Xyn10B to xylan hydrolysis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65**: 41-47.
- Amselem, J., *et al.* 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* **7**: e1002230.
- Anbarasan, S., Jänis, J., Paloheimo, M., Laitaoja, M., Vuolanto, M., Karimäki, J., Vainiotalo, P., Leisola, M. y Turunen, O. 2010. Effect of Glycosylation and Additional Domains on the Thermostability of a Family 10 Xylanase Produced by *Thermopolyspora flexuosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 356-360.
- Belien, T., Van, C. S., Robben, J. y Volckaert, G. 2006. Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1072-1081.
- Benito, E. P., Arranz, M. y Eslava, A. P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* **17**: S43-S46.
- Benito, E. P., ten Have, A., van't Klooster, J. W. y Van Kan, J. A. L. 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 207-220.
- 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. 2014. 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.
- 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.
- Collins, T., Gerday, C. y Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 3-23.
- Dean, R., van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di, P. A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414-430.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems; An Introduction, p. 1-8. *En*: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Espino, J., Gonzalez, M., Gonzalez, C. y Brito, N. 2014. Efficiency of different strategies for gene silencing in *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 9413-9424.
- Espino, J. J., Gutierrez-Sanchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R. y Gonzalez, C. 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* **10**: 3020-3034.
- García, N. Silenciamiento de múltiples genes en *Botrytis cinerea* mediante PTGS. Aplicación al estudio del papel en la virulencia de las xilanasas secretadas por el hongo. 2014. Trabajo de Fin de Grado. Grado en Biología. Universidad de La Laguna. España.
- García, N. Papel en la virulencia de las xilanasas extracelulares del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Análisis de cepas silenciadas en múltiples xilanasas. 2015. Trabajo de Fin de Máster. Máster en Biotecnología. Universidad de La Laguna. España.

- González, C., Noda, J., Espino, J. J. y Brito, N.** 2008. Drill-assisted genomic DNA extraction from *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters* **30**: 1989-1992.
- González, M., Brito, N. y Gonzalez, C.** 2014. Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein-*O*-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology* **14**: 254.
- González-Fernández, R., Valero-Galvín, J., Gómez-Gálvez, F. J. y Jorrín-Novo, J. V.** 2015. Unraveling the in vitro secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Idicula-Thomas, S. y Balaji, P. V.** 2005. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Science* **14**: 582-592.
- Ikai, A.** 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry* **88**: 1895-1898.
- Jiang, L., He, L. y Fountoulakis, M.** 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography. A* **1023**: 317-320.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E. y Van Kan, J. A. L.** 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant Journal* **43**: 213-225.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Leskinen, S., Mantyla, A., Fagerstrom, R., Vehmaanpera, J., Lantto, R., Paloheimo, M. y Suominen, P.** 2005. Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology Biotechnology* **67**: 495-505.
- Li, B., Wang, W., Zong, Y., Qin, G. y Tian, S.** 2012. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* **11**: 4249-4260.
- Liao, H., Zheng, H., Li, S., Wei, Z., Mei, X., Ma, H., Shen, Q. y Xu, Y.** 2015. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Sci Rep.* **5**:12631.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. y Legendre, L.** 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiology Ecology* **43**: 359-366.
- Meissner, K., Wassenberg, D. y Liebl, W.** 2000. The thermostabilizing domain of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima* represents a novel type of binding domain with affinity for soluble xylan and mixed-linkage beta-1,3/beta-1, 4-glucan. *Molecular Microbiology* **36**: 898-912.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. y Geiger, H. H.** 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**: 6115-6116.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. **9**: 255-262.
- 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.
- Patel, R. M., van Kan, J. A., Bailey, A. M. y Foster, G. D.** 2010. Inadvertent gene silencing of argininosuccinate synthase (*bcass1*) in *Botrytis cinerea* by the pLOB1 vector system. *Molecular Plant Pathology* **11**: 613-624.
- Patel, R. M., Van Kan, J. A. L., Bailey, A. M. y Foster, G. D.** 2008. RNA-mediated gene silencing of superoxide dismutase (*bcsod1*) in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**: 1334-1339.

- Payne, C. M., Resch, M. G., Chen, L., Crowley, M. F., Himmel, M. E., Taylor, L. E., Sandgren, M., Stahlberg, J., Stals, I., Tan, Z. y Beckham, G. T. 2013. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**: 14646-14651.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. y van Kan, J. A. L. 2000. Infection Strategies of *Botrytis cinerea* and Related Necrotrophic Pathogens, p. 33-64. En: Kronstad, J. W. (ed.), *Fungal Pathology*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Ribeiro, L. F., De Lucas, R. C., Vitosque, G. L., Ribeiro, L. F., Ward, R. J., Rubio, M. V., Damasio, A. R., Squina, F. M., Gregory, R. C., Walton, P. H., Jorge, J. A., Prade, R. A., Buckeridge, M. S. y Polizeli, M. L. 2014. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnol Biofuels*. **7**: 115-117.
- Schumacher, J., de Larrinoa, I. F. y Tudzynski, B. 2008. Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development, and Full Virulence on Bean Plants. *Eukaryotic Cell* **7**: 584-601.
- Shirane, N., Masuko, M. y Hayashi, Y. 1988. Nuclear behavior and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **78**: 1627-1630.
- Singh, N., Jain, N., Kumar, R., Jain, A., Singh, N. K. y Rai, V. 2015. A comparative method for protein extraction and 2D-gel electrophoresis from different tissues of *Cajanus cajan*. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Srivastava A K. 2015. A comparison of protein extraction methods using organic solvents for secretome of *Aspergillus fumigatus* strain (MTCC 1811). *International Journal of Scientific Research* **4**: 708-709.
- Stahmann, K.-P., Monschau, N., Sahm, H., Koschel, A., Gawronski, M., Conrad, H., Springer, T. y Kopp, F. 1995. Structural properties of native and sonicated cinerean, a beta-(1,3)(1,6)-glucan produced by *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Research* **266**: 115-128.
- Subramaniyan, S. y Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33-64.
- ten Have, A., Tenberge, K., Benen, J. A. E., Tudzynski, P., Visser, J. y Van Kan, J. A. L. 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens, p. 341-358. En: Kempken, F. (ed.), *The Mycota XI: Agricultural Applications*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- van Kan, J. A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247-253.
- Wessel, D. y Flüggé, U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**: 141-143.
- 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.

REFERENCIAS A PÁGINAS WEB

1. <http://www.gobcan.es/agricultura>. Fecha de acceso: 02/04/2016.
2. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/>. Fecha de acceso: 02/04/2016.
3. <http://pfam.xfam.org>. Fecha de acceso: 31/03/2016.
4. <http://prosite.expasy.org/>. Fecha de acceso: 31/03/2016.
5. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Fecha de acceso: 31/03/2016.
6. <http://web.expasy.org/protparam/>. Fecha de acceso: 31/03/2016.
7. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Fecha de acceso: 31/03/2016.
8. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>. Fecha de acceso: 31/03/2016.