



FACULTADE DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

D.^a Paula Pérez Antelo

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL HUÉSPED VEGETAL CONTRA EL
PATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA***

**ESTUDO DA RESPOSTA DO HÓSPEDE VEXETAL CONTRA O PATÓXENO
*BOTRYTIS CINEREA***

**A RESEARCH ON THE PLANT HOST RESPONSE AGAINST THE PATHOGEN
*BOTRYTIS CINEREA***

Trabajo Fin de Grado

Julio 2025

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
1. OBJETIVOS.....	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Botrytis cinerea	9
2.2. Muerte celular programada.....	11
2.3. Sistema inmune de las plantas	13
2.3.1. Ruta del salicilato	15
2.3.2. Ruta del jasmonato y el etileno.....	16
2.4. Genes estudiados en la interacción B. cinerea y S. Lycopersicum	17
2.4.1. Genes de enzimas líticas y síntesis de tóxicos	17
2.4.2. Genes implicados en la muerte celular programada	19
2.5. RT-qPCR	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. Diseño de Cebadores.....	20
3.2. Preparación de medios de cultivo microbiológicos	23
3.2.1. Medio PDA	23
3.2.2. Medio PDB.....	23
3.3. Cultivo de Botrytis cinerea.....	24
3.4. Cultivo de plantas	25
3.5. Extracción de ADN.....	25
3.6. PCR	27
3.7. Electroforesis	29
3.8. Aislamiento de conidios B. cinerea.....	30
3.9. Inoculación de plántulas de tomate con B. Cinerea.....	31
3.10. Extracción de ARN	32
3.11. Síntesis de cDNA.....	33
3.12. RT-qPCR	34

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Validación de los cebadores diseñados	35
4.2. Medición de la expresión génica	38
4.2.1. Enzimas hidrolíticas y fitotóxicas	40
4.2.2. Regulación de la muerte celular programada	42
5. CONCLUSIÓN	45
6. BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Actualmente el tomate es un cultivo de gran importancia económica en todo el mundo. Un patógeno que produce grandes pérdidas económicas al atacar este cultivo es *Botrytis cinerea*, un patógeno fúngico necrotrófico que causa lesiones necróticas en el tejido infectado.

Se busca estudiar la interacción entre *B. cinerea* y su huésped *S. lycopersicum*. Para ello, se analizó el cambio en los niveles de expresión de genes implicados tanto en el mecanismo de ataque del patógeno (*BcNep1*, *BcPg6*), como en el mecanismo de defensa del huésped (*SlEt4*, *SlPat*, *SlCas3*, *SlDcd2*).

Se diseñaron cebadores para los genes a estudiar y, mediante técnicas microbiológicas, se realizó el cultivo del patógeno, *Botrytis cinerea*. Este cultivo del hongo se utilizó para la preparación de inóculos, los cuales se aplicaron sobre la planta huésped, *S. lycopersicum*, para obtener muestras de tejido infectado. De estos tejidos se extrajo el ARN que, una vez retrotranscrito a ADNc, se analizó empleando la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Los resultados obtenidos mostraron una variación en los niveles de expresión génica frente a los observados en las muestras control. Se observó la sobreexpresión de genes de *Botrytis* implicados en el proceso de virulencia (*BcNep1*, *BcPg6*) y de genes de *Solanum* implicados en la inmunidad vegetal, como son la producción de la fitohormona vegetal etileno (*SlEt4*), o proteínas de defensa (*SlPat*). En *Solanum* también se observó la expresión diferencial de los genes relacionados con la muerte celular, una metacaspasa (*SlCas3*) y una proteína relacionada con la respuesta hipersensible (*SlDcd2*). Estas dos proteínas representan dos tipos de muerte celular antagónicos en los que *Botrytis* parece estar involucrado, observándose sobreexpresión de la metacaspasa y represión de la respuesta hipersensible (HR).

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, *Botrytis cinerea*, expresión génica, inmunidad vegetal, muerte celular, interacción planta-patógeno, infección temprana.

RESUMO

Actualmente o tomate é un cultivo de gran importancia económica en todo o mundo. Un patóxeno que produce grandes perdas económicas ao atacar este cultivo é *Botrytis cinerea*, un patóxeno fúnxico necrotrófico que causa lesións necróticas no tecido infectado.

Búscase estudar a interacción entre *B. cinerea* e *S. lycopersicum*. Para iso, analizouse o cambio nos niveis de expresión de xenes implicados tanto no mecanismo de ataque do patóxeno (*BcNep1*, *BcPg6*), como no mecanismo de defensa do hóspede (*SlEt4*, *SlPat*, *SlCas3*, *SlDcd2*).

Deseñáronse cebadores para os xenes a estudar e, mediante técnicas microbiolóxicas, realizouse o cultivo do patóxeno, *Botrytis cinerea*. Este cultivo do fungo utilizouse para a preparación de inóculos, os cales se aplicaron sobre a plánta hóspede, *S. lycopersicum*, para obter mostras de tecido infectado. Destes tecidos extraeuse o ARN que, unha vez retrotranscrito a ADNc, analizouse empregando a técnica da PCR cuantitativa en tempo real (RT-qPCR).

Os resultados obtidos mostraron unha variación nos niveis de expresión xénica fronte aos observados nas mostras control. Observouse a sobreexpresión de xenes de *Botrytis* implicados no proceso de virulencia (*BcNep1*, *BcPg6*) e de xenes de *Solanum* implicados na inmunidade vexetal, como son a produción da fitohormona vexetal etileno (*SlEt4*) ou proteínas de defensa (*SlPat*). En *Solanum* tamén se observou a expresión diferencial dos xenes relacionados coa morte celular, unha metacaspasa (*SlCas3*) e unha proteína relacionada coa resposta hipersensible (*SlDcd2*). Estas dúas proteínas representan dous tipos de morte celular antagónicos nos que *Botrytis* parece estar involucrado, observándose sobreexpresión da metacaspasa e represión da resposta hipersensible (HR).

Palabras chave: *Solanum lycopersicum*, *Botrytis cinerea*, expresión xénica, inmunidade vexetal, morte celular, interacción planta-patóxeno, infección temperá.

ABSTRACT

Currently, tomato is a crop of great economic importance worldwide. A pathogen that attacks this crop producing great economic losses is *Botrytis cinerea*, a necrotrophic fungal pathogen that causes necrotic lesions in the infected tissue.

We aimed to study the interaction between *B. cinerea* and *S. lycopersicum*. For this purpose, we analyzed the variation on the genes' expression levels involved in the pathogen attack mechanism (*BcNep1*, *BcPg6*), as well as in the host defense mechanism (*SlEt4*, *SlPat*, *SlCas3*, *SlDcd2*).

We designed primers for gene expression measurement and *B. cinerea* was cultured utilizing microbiological techniques. This fungus' culture was used to prepare inoculums, which were then applied to the host plant, *S. lycopersicum*, to obtain samples of infected tissue. RNA was extracted from these tissues and, once retrotranscribed to cDNA, it was analyzed using the real-time quantitative PCR technique (RT-qPCR).

The results obtained showed a variation in the levels of xenomic expression compared to those observed in the control samples. Overexpression of *Botrytis*' genes involved in the virulence process (*BcNep1*, *BcPg6*) and of *Solanum*'s genes involved in plant immunity, such as the production of ethylene (*SlEt4*), a phytohormone, or defense proteins (*SlPat*), was observed. Differential expression of cell death-related genes, a metacaspase (*SlCas3*) and a hypersensitive response-related protein (*SlDcd2*) was also observed in *Solanum*. These proteins represent two types of antagonistic cell death in which *Botrytis* appears to be involved, with overexpression of the metacaspase and repression of the hypersensitive response (HR) being observed.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *Botrytis cinerea*, genetic expression, plant immunity, cell death, plant-pathogen interaction, early infection.

1. OBJETIVOS

El objetivo general del presente estudio es caracterizar a nivel molecular la interacción planta-patógeno entre el huésped *Solanum lycopersicum* y el patógeno *Botrytis cinerea*. Para ello, se parte de análisis transcriptómicos previos para estudiar rutas concretas, específicamente relacionadas con la muerte celular e inmunidad vegetal.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Diseño de cebadores y su validación para el estudio de expresión génica.
2. Obtención de muestras biológicas de *Solanum lycopersicum* inoculado con *Botrytis cinerea*.
3. Medición de la expresión génica relativa de las muestras obtenidas mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

2. INTRODUCCIÓN

La sociedad actual está cada vez más concienciada con la búsqueda de un modelo de vida que sea sostenible con el planeta y que, a su vez, repercuta de forma favorable a nivel económico. Uno de los objetivos que esto engloba es la reducción del uso de químicos empleados para proteger los cultivos de los diferentes patógenos que los amenazan diariamente. Para ello, es indispensable estudiar los mecanismos de interacción planta-patógeno.

Uno de los numerosos patógenos que afecta los cultivos a nivel mundial es *Botrytis cinerea*. Se estima que es responsable de

pérdidas económicas que oscilan entre los 10 y los 100 billones de USD, afectando hasta a 1400 especies vegetales. Algunas de estas especies se muestran en la figura 1, que incluye tanto cultivos ornamentales como alimentarios infectados con este hongo (Roca-Couso et al., 2021).



Figura 1. Plantas infectadas por *Botrytis cinerea*. De izquierda a derecha, y de arriba a abajo: vid, fresa, rosa blanca, tomate, orquídea, rosa (Shutterstock, 2025).

Entre las especies vegetales que se ven amenazadas se hayan algunas de gran importancia económica como *Solanum lycopersicum*, la planta del tomate. España es el octavo país del mundo que más toneladas ha producido de tomate entre el 2020-2023, con 4,17 millones de toneladas de promedio por año, y con un área cultivada de 51.705 ha (FAOSTAT,

2025). La importancia a nivel global de la producción de tomate se ve reflejada en la figura 2, en la que se muestran los países productores coloreados según las toneladas producidas en promedio entre los años 2020 y 2023.

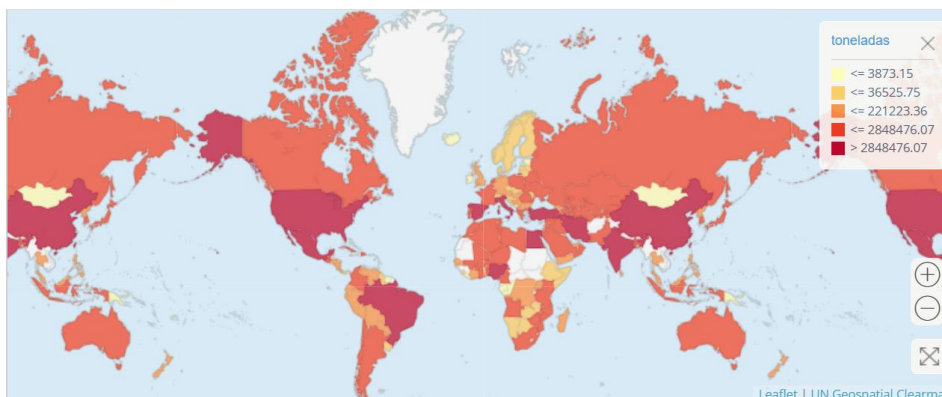


Figura 2. Mapa de los países según su producción de tomates promedio entre 2020 y 2023 (FAOSTAT, 2025).

2.1. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un patógeno fúngico causante de la enfermedad del moho gris. Un hongo necrotrófico que causa lesiones grises al descomponer los tejidos de la planta y convertirlos en masa fúngica (van Kan, 2006). Es preciso diferenciar los términos biotrofo y necrotrofo. El primero, biotrofo, hace referencia a aquellos patógenos que se alimentan del tejido vivo del huésped, mientras que aquellos patógenos necrotrófos, como es el caso de *Botrytis*, se alimentan del tejido muerto (Glazebrook, 2005).

Inicialmente la infección causada por *Botrytis* se creía inespecífica, el hongo producía enzimas de degradación de la pared celular y toxinas, factores que se consideraban determinantes para establecer la gravedad de la infección. Sin embargo, estudios posteriores describieron que el proceso de infección era más complejo (Bi et al., 2023; Veloso & van Kan, 2018).

El proceso de infección cuenta con varias fases (figura 3). Comienza con la germinación de conidios en la superficie de la planta. Los conidios desarrollan estructuras necesarias para

que el hongo penetre al interior de la planta. En un inicio se desarrolla el tubo de infección (GT) entre 4-6 horas tras la inoculación, y a las 12-18 horas se forma el apresorio. Esta estructura fúngica es importante para el proceso de infección ya que permite la penetración del hongo en el tejido del huésped. El apresorio se adhiere a la superficie de la planta y crea una presión hidrostática elevada que rompe el tejido y permite la entrada del hongo. Además, asiste tanto en la penetración de la cutícula y de la pared celular, como en la secreción de otras moléculas que facilitan la entrada del patógeno en el tejido, como son las enzimas degradativas, toxinas o efectores. Los efectores son sustancias que regulan la respuesta del huésped, entre las que se pueden encontrar inhibidores de la respuesta inmune vegetal o reguladores de muerte celular (Hofius et al., 2009).

Tras la penetración del patógeno en el tejido del huésped se diferencian dos fases. Durante las primeras 24 horas el hongo permanece en la zona superficial del tejido vegetal. En esta etapa inicial el patógeno secreta sustancias (efectores) que inhiben la respuesta inmune de la planta, permitiéndole crecer en el interior del tejido vegetal y, una vez acumulada la suficiente masa fúngica, se produce el paso a una infección necrótica que se caracteriza por la producción de sustancias para degradar y destruir el tejido vegetal (Bi et al., 2023).

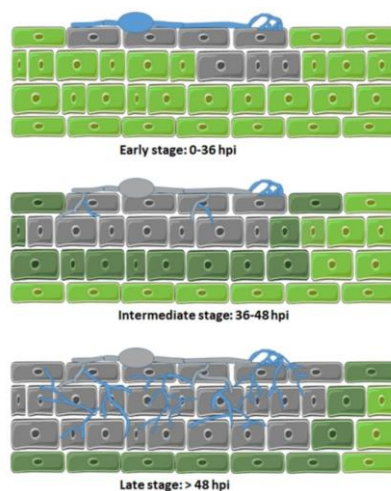


Figura 3. Fases del proceso de infección del patógeno *B. cinerea* durante la interacción con el huésped (Bi et al., 2023).

Entre los efectores secretados por el patógeno se pueden encontrar RNAs pequeños que regulan la respuesta inmune de la planta. En un inicio, *Botrytis* inactiva las defensas de la planta mediante el uso de RNAs pequeños que se translocan al huésped, silenciando, así, genes implicados en la respuesta inmune (Qin et al., 2023; Veloso & van Kan, 2018).

Pese a su importancia, los RNAs no son los únicos efectores empleados y secretados por el patógeno. Los más estudiados son los efectores proteicos, que también actúan silenciando la respuesta inmune, entre los que se encuentran las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Liyao Su et al., 2024).

También son considerados efectores ciertos metabolitos secundarios. Se han realizado estudios sobre el mecanismo de defensa contra *Sclerotinia sclerotium*, un hongo de la misma familia que *Botrytis* que, en lugar de causar lesiones grises, provoca lesiones blancas. Es también un patógeno necrotrofo en el que se ha visto que tiene mucha importancia el ácido oxálico (OA) a nivel de la regulación del mecanismo de defensa. Se han intentado replicar estas investigaciones con *Botrytis* pero los resultados obtenidos indican que el papel del OA no presenta la misma importancia en *Botrytis* (Bi et al., 2023; Cessna et al., 2000).

Actualmente se considera que *B. cinerea* no es completamente necrotrófico sino que atraviesa una, muy corta, fase biotrófica inicial en la que no produce la muerte de las células vegetales, pero sí se inhibe la respuesta inmune. Esta respuesta consiste en una muerte celular programada dependiente de la autofagia que activa una respuesta local, respuesta hipersensible (HR), en la cual las células que entran en contacto con el patógeno mueren, creando una barrera que impide su propagación por el tejido (Bi et al., 2023; Hofius et al., 2009).

2.2. Muerte celular programada

Los efectores, como se ha comentado anteriormente, son sustancias que regulan la respuesta inmune del huésped, induciendo o inhibiendo la muerte celular programada. En la etapa inicial, *Botrytis* silencia la muerte celular dependiente de autofagia, sin embargo, en la fase tardía induce la muerte celular por apoptosis.

Las plantas cuentan, principalmente, con dos tipos de muerte celular que se pueden inducir ante situaciones de estrés (Kabbage et al., 2013), la apoptosis y la autofagia. En plantas, estos son dos procesos homólogos a los que tienen lugar en células animales (Yagy & Yoshimoto, 2024). Ambos procesos se encuentran en equilibrio de forma que la activación de un proceso inhibe al contrario, considerándose mecanismos antagonistas (Velo & van Kan, 2018).

A pesar de que la activación de cualquiera de los dos procesos suele desencadenar muerte celular, y por consiguiente, tejido necrótico, son regulados por mecanismo distintos y tienen características que permiten diferenciarlos.

La apoptosis tiene como consecuencia la muerte de la célula y la expulsión de nutrientes y estructuras celulares al medio intercelular. En cambio, el proceso de autofagia no siempre acaba en la muerte celular. La autofagia es un proceso de reciclaje de componentes celulares dañados que, en caso de que el daño sea muy intenso, deriva en una muerte celular en la que los componentes celulares son degradados y el contenido citoplasmático liberado al romperse la membrana (Velo & van Kan, 2018).

En la figura 4 se muestran tres posibles escenarios una vez *B. cinerea* ha penetrado en el huésped. Si se trata de una planta resistente (a), la interacción con el patógeno inducirá la muerte celular por autofagia en las células, produciendo resistencia.

En el segundo caso (b), la planta no detecta la intrusión, y por consiguiente, no se activa ninguno de los dos tipos de muerte celular. Esto se conoce como colonización asintomática. En este caso el patógeno crece de manera limitada sin producir síntomas de enfermedad, no hay pudrición ni muerte celular. Sin embargo, situaciones de estrés en la planta pueden desencadenar la aparición de los síntomas (Velo & van Kan, 2018).

La última situación (c) se aplica a plantas descritas como susceptibles a la infección. Tras darse la interacción patógeno-huésped, durante la fase temprana biotrofa no se induce autofagia como en el caso de las plantas resistentes, si no que el patógeno crece hasta alcanzar

una masa crítica a partir de la cual induce la apoptosis en el huésped. Para llevar a cabo esta inducción, *Botrytis* produce efectores que activan la apoptosis, asegurando así la inhibición de la autofagia al tratarse de procesos antagónicos (Veloso & van Kan, 2018).

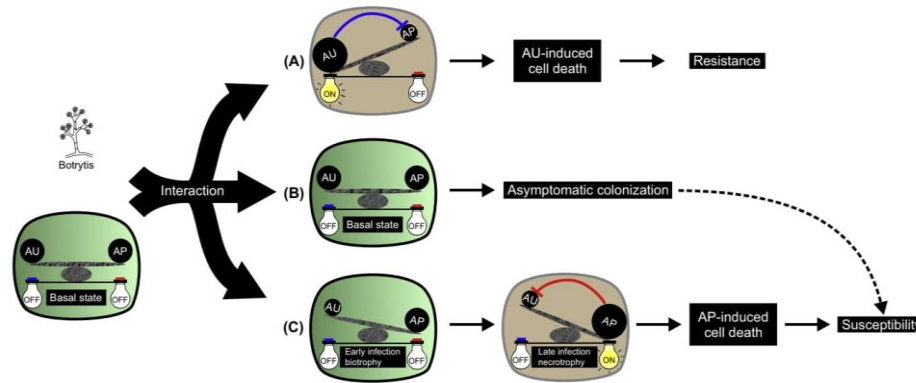


Figura 4. Equilibrio entre la apoptosis y la autofagia celular tras la interacción entre célula vegetal y *Botrytis cinerea* (Veloso & van Kan, 2018).

Como resultado, se relaciona la apoptosis con susceptibilidad ante la infección, mientras que la autofagia se asocia con la resistencia (Zhang, 2020).

2.3. Sistema inmune de las plantas

La entrada del patógeno en el huésped puede ser percibida mediante receptores PRR (Pattern Recognition Receptor) (figura 5). Los receptores PRR se unen a PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) o DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) para activar la respuesta inmune. Los PAMPs son moléculas provenientes del patógeno, normalmente moléculas de la pared celular o la membrana del patógeno. Por el contrario, los DAMPs son moléculas de la propia planta que se generan por degradación de los componentes del huésped durante la interacción con el patógeno.

El reconocimiento mediante los receptores PRR del huésped desencadena una cascada de señalización entre los que se incluyen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la cascada de señalización de las MAPK y diversas señales que convergen en la síntesis de fitohormonas. Las fitohormonas más importantes durante la respuesta inmune son el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico, que actúan como mensajeros secundarios de la activación

de genes implicados en la defensa de la planta. Este tipo de respuesta, mediada por receptores PRR, es una respuesta de tipo PTI (Inmunidad Activada por PAMP), que corresponde con el caso “a” de la figura 5 (Pieterse et al., 2009).

Sin embargo, también existe la respuesta ETI (Inmunidad Activada por Efectores). Los efectores, mencionados anteriormente como sustancias reguladoras de la respuesta del huésped, son producidos por el patógeno y reconocidos por receptores citoplasmáticos de las células del huésped. En la figura 5 aparecen representados como estrellas en el caso “b”. La función de estos efectores es interrumpir la cascada de señalización causada por el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, actuando como inhibidores de la respuesta inmune o reguladores de otras respuestas como la muerte celular programada. En el caso “c” de la figura 5 se puede observar la presencia de estos receptores citoplasmáticos, conocidos como proteínas R (proteínas de resistencia), que son capaces de reconocer la presencia de los efectores en la célula y desencadenar la activación de la respuesta inmune de la planta.

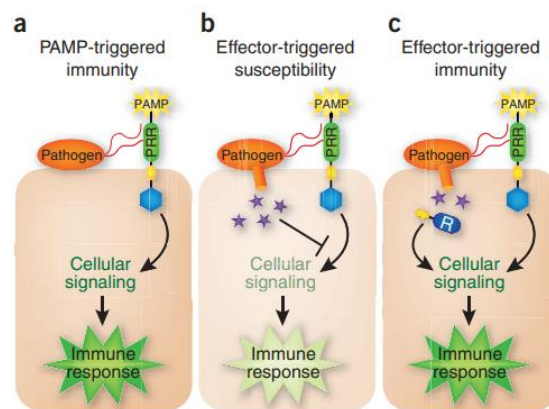


Figura 5. Esquema de la activación de la respuesta inmune ante la presencia de un patógeno (Pieterse et al., 2009).

Los elicitores y los efectores son las moléculas que inician la activación de la inmunidad vegetal. Sin embargo, los elicitores y los efectores se diferencian en varios aspectos importantes. Los efectores son moléculas muy específicas producidas por cepas concretas del patógeno, y detectadas por receptores citoplasmáticos (proteínas R) de las células del huésped. En cambio, los elicitores son moléculas presentes en un espectro más amplio de patógenos,

como puede ser, por ejemplo, la flagelina presente en un amplio rango de especies bacterianas. Estos elicitores son detectados por receptores (receptores PRR) presentes en la membrana de las células, produciendo la cascada de señalización que lleva a la activación de la respuesta inmune de las células atacadas. Por tanto, a pesar de que ambas son moléculas cuyo reconocimiento desencadena la respuesta inmune, difieren en el mecanismo de percepción, y en la especificidad de la respuesta inmune desencadenada (Burbano-Figueroa, 2020).

La percepción del patógeno y posterior cascada de señalización deriva en la activación de dos posibles rutas de inmunidad: la ruta del salicilato y la ruta del jasmonato/etileno. Estas dos rutas dependen de las fitohormonas anteriormente mencionadas y tienen un papel antagonista en la mayoría de los casos. A pesar de que cada ruta está asociada a la defensa contra un tipo de patógeno (biotrofo o necrotrofo), hay casos en los que no ocurre así, como se indica con las flechas punteadas en la figura 6 (Li & Ahammed, 2023).

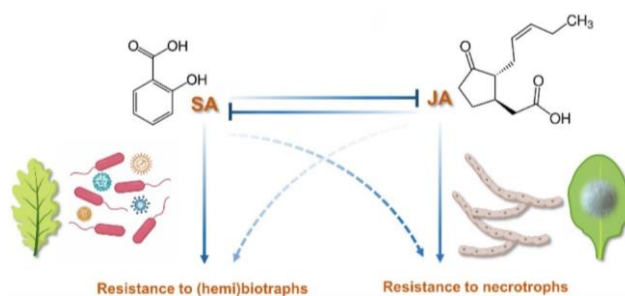


Figura 6. Interacción de las rutas del ácido salicílico (SA) y del ácido jasmónico (JA) entre sí y con los patógenos contra los que actúan (Li & Ahammed, 2023).

Botrytis, como patógeno necrotrófico se relaciona, principalmente, con la respuesta de la vía del jasmonato y el etileno. Se ha estudiado que esta vía induce una respuesta inmune que es eficaz contra este tipo de patógenos. Entre otros, produce la activación de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) e inhibe el estrés oxidativo inducido por patógenos al promover la transcripción de enzimas antioxidativas (Yu et al., 2019).

2.3.1. Ruta del salicilato

La vía dependiente del ácido salicílico es esencial contra la defensa ante patógenos biotróficos o hemibiotróficos (Li & Ahammed, 2023). Ante el reconocimiento de un patógeno biotrofo, tiene lugar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la acumulación de ácido salicílico (SA), que se encarga de activar proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR). Estas proteínas PR incluyen una amplia variedad de proteínas cuya función es limitar el crecimiento del patógeno, como pueden ser enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas), o enzimas que producen sustancias tóxicas (fitoalexinas) para el patógeno. El SA en concentraciones elevadas puede activar la respuesta hipersensible (HR), una respuesta local que provoca la muerte celular programada (Veloso et al., 2014).

2.3.2. Ruta del jasmonato y el etileno

La ruta que implica al ácido jasmónico y al etileno se ha descrito como beneficiosa para la defensa contra patógenos necrotróficos (Li & Ahammed, 2023; Yu et al., 2019). En esta vía se ve aumentada la síntesis de ambas fitohormonas como respuesta a heridas, insectos o necrotrofos (Pieterse et al., 2009).

En la figura 7 se representa cómo, ante la presencia del patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, se activa la vía del jasmonato y el etileno, que desencadenan la activación de proteínas PR entre las que se encuentran proteinasas e inhibidores de proteinasas. El tipo de proteínas PR activadas por la ruta JA/ET es distinto a las activadas por la vía del SA a pesar de que su función es la misma, limitar el crecimiento del patógeno (Yu et al., 2019).

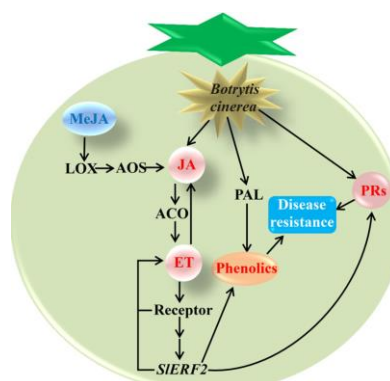


Figura 7. Ruta del ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) para la activación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) (Yu et al., 2019).

2.4. Genes estudiados en la interacción *B. cinerea* y *S. Lycopersicum*

La interacción entre *B. cinerea* y *S. lycopersicum* tiene como consecuencia un cambio en la expresión de numerosos genes entre los que se pueden diferenciar dos vertientes. La primera incluye aquellos genes relacionados con la producción de enzimas líticas y productos tóxicos, que atacan al patógeno o al huésped en función de quién las produzca, mientras que la otra vertiente se centra en genes que codifican para la regulación de la muerte celular programada.

Los siguientes fueron escogidos por su relación con el mecanismo de defensa contra *Botrytis cinerea* o su importancia en el proceso de colonización.

2.4.1. Genes de enzimas líticas y síntesis de tóxicos

Como parte del mecanismo de defensa de las plantas se encuentra la producción de enzimas líticas contra el patógeno. Dentro de este grupo de genes se incluye *SIPat*, un gen de defensa que codifica para las *patatin-like* en *Solanum lycopersicum*, enzimas que hidrolizan ácidos grasos y que se ha observado que son dependientes de la ruta metabólica del ácido salicílico (La Camera et al., 2005).

En *Arabidopsis*, el gen PLP2 (*patatin-like protein 2*) codifica para una acil-hidrolasa lipídica (LAH), encargada de romper ácidos grasos. Estas enzimas (*patatin-like protein*) modulan la resistencia o la susceptibilidad a patógenos mediante diversos mecanismos como la síntesis de fitohormonas, la activación de la muerte celular programada o un efecto antimicrobiano. En el caso de PLP2, se observó un aumento de su expresión durante la interacción con *Botrytis cinerea* que se relacionó con un aumento de la susceptibilidad del huésped. Esta susceptibilidad se relaciona con un aumento de la muerte celular programada apoptótica durante la interacción con *Botrytis cinerea* (La Camera et al., 2005). Se cree que

PLP2 no está implicado directamente en el mecanismo de apoptosis pero sí en su activación (Grienenberger et al., 2010).

El gen *SIEt4* está implicado en la síntesis del etileno, una hormona vegetal relacionada con la ruta del jasmonato. Concretamente, este gen codifica para la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC), enzima clave en la ruta de síntesis del etileno al actuar en un paso limitante (Park et al., 2021).

Además de enzimas líticas y tóxicos producidos por la planta, también actúan en esta interacción los producidos por el patógeno. El gen *BcPgg6* codifica en *Botrytis* para la proteína poligalacturonasa 6. Esta proteína es secretada durante la infección y es una enzima que actúa degradando la pared celular de las células vegetales. Las endopoligalacturonasas ayudan a penetrar en la capa epidérmica que se encuentra tras la cutícula, favoreciendo una infección rápida en la que aparecen lesiones de forma temprana (van Kan, 2006).

Estas enzimas hidrolizan las poligalacturonas, polisacáridos estructurales de la pared celular. Se consideran factores de virulencia y se ha observado que, en función de la especie que las produzca, muestran propiedades bioquímicas y actividad necrotizante diferentes, debido a modificaciones postraduccionales como es la glicosilación (Bolton et al., 2006).

Dentro de los efectos tóxicos del patógeno se sitúa el gen *BcNep1* (Necrosis and Ethylene-inducing Peptide), que codifica para una proteína NLP (*NEP1-like protein*). Las proteínas NLP son producidas por *Botrytis* durante la interacción con el huésped e inducen la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y etileno en este, teniendo un efecto tóxico para la planta (Pemberton & Salmond, 2004).

El caso del gen *BcNep1* es algo controvertido. Se considera que tiene un doble efecto sobre las células para causar necrosis. Por un lado, tiene un efecto tóxico sobre la célula vegetal, y por el otro, se lo relaciona con la activación de la muerte celular programada del huésped. Se desconoce si tiene una mayor importancia la actividad tóxica de las NLP o su actividad como elicitores para desencadenar muerte celular, lo que sí se reconoce es su importancia en el

proceso de invasión, pues se le considera un factor de virulencia, observándose una invasión más lenta y dificultosa al inactivar este gen (Gijzen & Nürnberger, 2006).

2.4.2. Genes implicados en la muerte celular programada

Los dos tipos de muerte celular programada en los que se centra este estudio son la muerte apoptótica y la autofágica. El gen *SICas3* está relacionado con la muerte apoptótica, ya que un aumento en su expresión indica que se está llevando a cabo este tipo de muerte.

SICas3 codifica para la metacaspasa 3, una enzima necesaria para que se produzca la apoptosis en las células. En plantas, en lugar de encontrar caspasas como en animales, se encuentran metacaspasas, proteínas análogas. Frente a la interacción de la planta de tomate con *Botrytis*, se produce un aumento de los niveles de ARNm, es decir, de la expresión del gen, por lo que se lo relaciona con la aparición de las primeras lesiones necróticas (Hoeberichts et al., 2003).

La metacaspasa I es un factor regulador positivo de la muerte celular programada que sigue una ruta paralela a la autofagia. Se relaciona con la ruta del salicilato, que regula la respuesta hipersensible (HR) de la planta una vez detectada la presencia del patógeno en caso de que se acumulen concentraciones elevadas de esta fitohormona. En este caso, la autofagia es regulada negativamente (Coll et al., 2014).

Para el seguimiento de la muerte por autofagia se puede emplear *SIDcd2* como marcador. El dominio Dcd se encuentra en proteínas implicadas en el desarrollo y la muerte celular programada en plantas, y solo se ha observado en células vegetales. Se relaciona su expresión, más que con una respuesta a la interacción con un patógeno, con una respuesta a la muerte celular programada al verse aumentada su expresión durante la activación de la muerte celular por autofagia (Tenhaken et al., 2005).

2.5. RT-qPCR

La técnica de Real Time qPCR se empleará para cuantificar la expresión de los genes citados en el párrafo anterior. Esta técnica cuantifica en tiempo real la expresión génica combinando la PCR con el uso de fluoróforos para monitorizar la amplificación de la PCR en cada ciclo (Harshitha & Arunraj, 2021).

La Real Time qPCR es una técnica con una alta sensibilidad y especificidad que detecta el cambio en los niveles de fluorescencia durante la PCR. Es común el uso de SYBR green, un colorante que se intercala en el ADN durante la fase de extensión del cebador mediado por la polimerasa (Arya et al., 2005).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño de Cebadores

El diseño de cebadores se realizó empleando el programa Primer-Blast del NCBI. A partir de la secuencia FASTA de los genes de interés se diseñaron cebadores para 13 genes de *Botrytis cinerea* y 13 de *Solanum lycopersicum*, de los cuales, en este trabajo solo se emplearon 8, tres para *Botrytis* (tabla 1) y cinco para *Solanum* (tabla 2). El criterio seguido para determinar que genes se emplearían finalmente para la medida de expresión mediante RT-qPCR, fue escoger aquellos cebadores con los que se obtuvo una mejor amplificación en la PCR convencional.

Los 26 genes propuestos inicialmente fueron escogidos por haberse demostrado un cambio en su expresión ante la interacción del patógeno (*Botrytis cinerea*) con el huésped (*Solanum lycopersicum*). Son genes cuyo máximo de expresión se encuentra a partir de las 12 horas post-inoculación (Qin et al., 2022).

	Temperatura de melting del cebador(°C)	Tamaño del Amplicón (pb)	Secuencia Cebadores
<i>BcNep1</i> – Necrosis and ethylene inducing protein 1	60	175	<i>Fw</i> - CGACTGGGAGTATGTCTCGTCG
			<i>Rv</i> - CTGCAACTCGTGGTTGGTTG
<i>BcPg6</i> - Endopolygalacturonase	60	336	<i>Fw</i> - ACTATCACCGGTGCTGTTGG
			<i>Rv</i> - AGCTCCGTTGCTGGAATTGA
<i>BcTub</i> – Beta-tubulin	60	125	<i>Fw</i> - AACTCTCCGTCCCGACAAC
			<i>Rv</i> - AGCTTCACGACGGACAACAT

Tabla 1. Genes estudiados en *Botrytis cinerea* y sus cebadores.

	Temperatura de melting del cebador(°C)	Tamaño del Amplicón (pb)	Secuencia Cebadores
<i>SIet4</i> – 1-aminociclopropane-1-carboxylic acid synthase-2	60	383	<i>Fw</i> - GTGGTGCCACTGGAGCTAAT
			<i>Rv</i> - ACTGACGAATTGAGGCGTGT
<i>SIcas3</i> - Metacaspase 1 (AHRD V3.3 *** AT1G02170.1), Pfam:PF00656	60	197	<i>Fw</i> - GGTGCAAAGTCCATTCGCTG
			<i>Rv</i> - ATACCTACGATGACCGCCCT

<i>SIPat</i> – Patatin (AHRD V3.3 *** K4BV10_SOLLC)	60	201	<i>Fw</i> - CATAGATGGTGGCGTTGCG
			<i>Rv</i> - ACAATCCCCCATTTTGCTCC
<i>SIDcd2</i> - DCD (Development and Cell Death) domain protein (AHRD V3.3 --* AT2G35140.6)	60	173	<i>Fw</i> - TAGGAAGCTTGTGCGTCCAG
			<i>Rv</i> - TCATGCCCCAAGTCATCACC
<i>SITub</i> – Beta-tubulin	60	180	<i>Fw</i> - AACCTCCATTCAGGAGATGTTT
			<i>Rv</i> - TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT

Tabla 2. Genes estudiados en *Solanum lycopersicum* y sus cebadores.

Durante el proceso de diseño de cebadores hay varios parámetros que se deben tener en cuenta. El primero es la temperatura de *melting* (T_m), cuyo valor deseado ha sido $60^\circ\text{C} \pm 2$. Es necesario que la T_m sea similar entre los cebadores porque se realizarán simultáneamente varias PCR en el termociclador y, si las T_m fueran distintas, no se produciría amplificación en todas las muestras introducidas.

Otro factor a tener en cuenta es el efecto *primer dimer*. Este consiste en la unión de ambos cebadores (*forward* y *reverse*) entre sí, de forma que no se produce su unión al material genético que debe ser amplificado y, por consiguiente, no se amplifica el gen durante la PCR. Para prevenirlo, los cebadores diseñados tienen una complementariedad de 0, o muy próxima a 0 siguiendo los parámetros de la herramienta primer-Blast.

Además, otro efecto que se tomó en consideración fue el *hairping*. Muy similar al *primer dimer*, con la diferencia de que, en lugar de producirse la unión de un cebador con el

otro, se produce la unión del cebador sobre sí mismo debido a la complementariedad del extremo 3'.

Por último, el tamaño del producto de la PCR que se busca se encuentra entre 100-500 kb, un tamaño no muy grande pues al emplearse la RT-qPCR los amplicones deben ser pequeños ya que los periodos de extensión son cortos.

3.2. Preparación de medios de cultivo microbiológicos

3.2.1. Medio PDA

El medio PDA está compuesto por Agar de Dextrosa de Patata, empleando la dextrosa como principal aporte de carbono. Es un medio general para el crecimiento de hongos. Para preparar estos medios se disuelven 11,7 g de PDA en 300 ml de agua destilada (39 g por cada 100 ml) y, posteriormente, se autoclava durante 45 minutos a 120°C para eliminar cualquier contaminación biológica que se haya podido dar durante el proceso. Una vez autoclavado, se debe agitar para homogeneizar el agar.

Por último, en una cámara de flujo, que previamente ha sido esterilizada empleando luz UV durante 15 min, se procede a verter el PDA preparado en placas Petri y se deja solidificar (figura 8).



Figura 8. Placas Petri con medio PDA

3.2.2. Medio PDB

El medio líquido PDB (figura 9) contiene dextrosa de patata, como el medio PDA, pero no agar. Para prepararlo, en un Erlenmeyer se disuelve 1,2 g de PDB en 100 ml agua destilada

y se autoclava igual que en el proceso anterior. Sin embargo, al no llevar agar no es necesario agitarlo posteriormente.



Figura 9. Erlenmeyer con medio líquido PDB

3.3. Cultivo de *Botrytis cinerea*

La siembra del patógeno *Botrytis cinerea* se realiza en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada con luz UV.

Para iniciar los cultivos se usa un stock de conidios de *Botrytis* conservado en glicerol 50% a -80°C . Con una micropipeta se coloca una gota de $2\ \mu\text{l}$ del stock de glicerol de *Botrytis* en el centro de una de las placas Petri con medio PDA. Con una varilla esterilizada empleando alcohol y un mechero bunsen se esparce la gota. Las placas sembradas se llevan a una cámara y se incuban en oscuridad a 25°C .

Una vez crecidos los medios de *Botrytis cinerea* en la placa Petri (figura 10), se traspasan a los medios líquidos PDB. Para ello, en una cámara de flujo laminar se cortan con una lanceta 5 cuadrados en el agar de $1\ \text{cm}^2$ de una placa y se introducen en uno de los Erlenmeyer con medio líquido PDB preparado anteriormente. Es importante trabajar en condiciones de esterilidad, prestando especial atención tanto a la lanceta como a la boca de los Erlenmeyer, que se deben calentar con el mechero Bunsen. Los medios líquidos PDB con los micelios se dejan crecer en un agitador a 100 rpm dentro de un incubador en oscuridad a temperatura ambiente durante 72 horas.

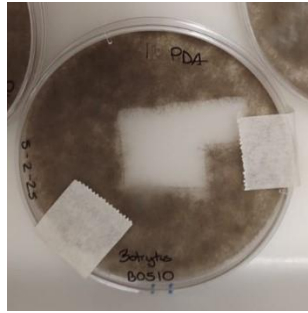


Figura 10. Cultivo *Botrytis cinerea* en placa Petri con medio PDA.

3.4. Cultivo de plantas

El cultivo de las plantas se llevó a cabo a partir de semillas de *Solanum lycopersicum*. En primer lugar se prepara la mezcla de sustrato, que consiste en 3 partes de tierra y 1 parte de perlita. Se rellenan los semilleros con la mezcla anterior, se colocan en una cubeta y se riegan con unos 250 ml de agua por bandeja (figura 11). A continuación, se colocan tres semillas por alvéolo del semillero y se depositan en el incubador, con media pulgada de agua en la cubeta. Las plantas se cultivarán con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 25°C y 8 horas de oscuridad a 20°C y una humedad relativa constante del 60%.

Para cada experimento se realizó una siembra independiente. Se realizaron dos experimentos de inoculación independientes.



Figura 11. Semilleros sembrados con *Solanum lycopersicum*.

3.5. Extracción de ADN

La extracción de ADN de *Solanum lycopersicum* se hizo a partir de hojas de las plantas cultivadas previamente, mientras que la extracción de *Botrytis cinerea* se realizó a partir de micelio crecido en el medio líquido PDB.

El ADN extraído se empleó para probar mediante PCR convencional los cebadores diseñados y determinar si amplificaban correctamente para, posteriormente, emplear estos cebadores en el análisis de expresión génica.

La muestra se machaca mecánicamente en un mortero tras ser congelada con nitrógeno líquido para facilitar el homogeneizado. Es importante mantener la temperatura baja para evitar la acción de enzimas encargadas de degradar los ácidos nucleicos. Se colocan 100 mg de la muestra machacada en un eppendorf de 1.5 ml, y una vez obtenida la muestra, se emplea el kit E.Z.N.A.® Plant and Fungal DNA para la extracción siguiendo el protocolo del fabricante.

Este kit cuenta con varias etapas. Una etapa inicial de lisis en la que la muestra machacada en forma de polvillo se mezcla con un primer tampón (P1 Buffer) y, tras un periodo de incubación, un segundo tampón (P2 Buffer). Estos tampones, un tampón de lisis y otro de neutralización, se encargan de lisar las células para extraer el ADN, y de inhibir las enzimas encargadas de degradar los ácidos nucleicos.

A continuación, hay una etapa de eliminación de restos celulares en la que, mediante sucesivas centrifugaciones a 10.000g y el uso de isopropanol 100%, se precipita el ADN en forma de pellet y se lavan los restos celulares y de los tampones anteriores.

La siguiente etapa consiste en el paso del ADN a través de una columna en la que quedará retenido. Para ello primero se resuspende el pellet en agua destilada y se trata con una RNAasa. Se añade un tercer tampón (Buffer 3) y etanol 70%, eliminando el ARN que pueda estar presente y separando el ADN de otros componentes haciendo que precipite. Se hace pasar el ADN por la columna centrifugando el tubo, donde queda retenido.

La siguiente es una etapa de lavado en la que, mediante un tampón de lavado, se elimina de la columna todo aquello que haya quedado retenido que no sea el ADN.

Finalmente, en la última etapa se eluye el ADN empleando un tampón de elución. Para maximizar la elución de ADN se incubó a temperatura ambiente dos minutos entre la adición del tampón y su centrifugación. En función del volumen de tampón de elución que se emplee, el ADN obtenido estará más o menos diluido. En este ensayo se empleó un volumen de 60 μl .

3.6. PCR

Las PCR convencionales se realizaron con la intención de comprobar si los cebadores diseñados en un inicio amplificaban correctamente los genes de interés. Primero se debe conocer la concentración de ADN que se obtuvo durante la extracción descrita anteriormente. Para ello, se mide la absorbancia (densidad óptica) en un espectrofotómetro a 260 nm. Se utilizan cubetas de cuarzo que permiten medir la absorbancia en los rangos de longitud de onda ultravioleta.

Para la muestra de *Solanum lycopersicum* se obtuvo una concentración de 820 nanogramos de ADN por microlitro. Esta concentración se obtiene multiplicando por el factor de dilución usado para la medida (200 veces) y aplicando la ley de Lambert-beer, siendo la densidad óptica del ADN de doble cadena de 50ng/ μl por cada unidad de densidad. Para *Botrytis cinerea* la concentración fue de 50 nanogramos de ADN por microlitro.

Tras conocer la concentración de ADN de las muestras, se preparan las diluciones de trabajo de los cebadores. Los cebadores empleados vienen liofilizados, por lo que, tras un espín para asegurar que los cebadores se encuentran en el fondo del tubo, se resuspenden con agua milli-q variando la cantidad en función del cebador para obtener una concentración 100 μM .

El programa de PCR empleado recomienda una cantidad de *template* (muestra) de 50ng, por lo que se puede realizar una dilución de la muestra para obtener una concentración de 50 ng/ μl que haga más sencillo los volúmenes de trabajo.

En un eppendorf se añaden los cebadores que, al tratarse de volúmenes muy pequeños (1 μl), se pipetea en una pared con cuidado de no arrastrar el contenido fuera del tubo al retirar la pipeta. A continuación, se prepara la MM (master mix) usando VWR® TAQ DNA

Polymerase y VWR® dNTPs. La MM está compuesta por los componentes comunes a las PCR y se realiza con el objetivo de reducir los errores asociados a pipetear cantidades pequeñas de forma repetida.

2,5 µl	10 x Taq Buffer
0,5 µl	10mM dNTPs
0,1 µl	5 U/µl Taq Pol.
19,9 µl	Agua

Tabla 3. Componentes de la master mix empleada para la PCR convencional.

Las cantidades de los reactivos de la tabla 3 son las necesarias para realizar una PCR, si se quisieran realizar más, se debe escalar los valores según el número de reacciones que se quieran llevar a cabo. Es importante realizar la master mix como último paso, pues se debe mantener en frío la Taq Polimerasa para su mejor conservación.

Una vez mezclados los cebadores, el ADN muestra y la master mix, se introducen en el termociclador con el siguiente programa (figura 12):

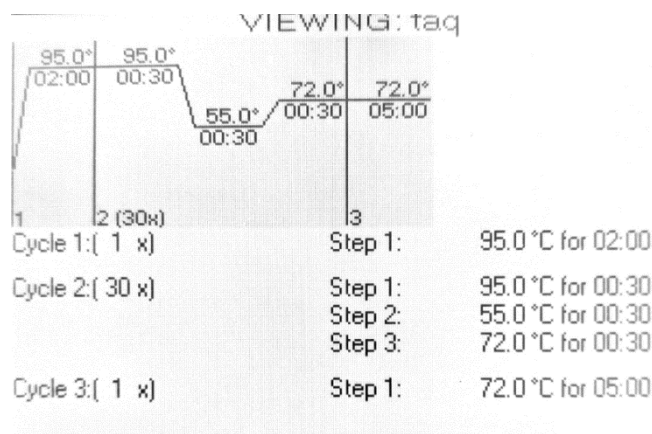


Figura 12. Programa PCR convencional empleado en las muestras de ADN.

El programa consta de tres ciclos. El primero es un paso desnaturalizante del ADN. Este paso no es imprescindible, pero al haber estado la muestra en hielo, sirve para asegurarse de que las cadenas de ADN estén separadas antes del primer anillamiento. El segundo ciclo consta de tres pasos que se repiten 30 veces, siendo el primer paso el encargado de

desnaturalizar el ADN (separar las cadenas); en el segundo se da la unión de los cebadores al ADN (anillamiento), dependiendo la temperatura de las características de los cebadores empleados; en el tercer y último paso de este ciclo, la polimerasa se encarga de sintetizar ADN (extensión) empleando el molde de ADN delimitado por los cebadores. El último ciclo (enlongación final) se encarga de que cadenas de ADN simples restantes sean amplificadas.

El producto de la PCR obtenido será conservado en el congelador a -20°C .

3.7. Electroforesis

La electroforesis se realiza para visualizar los productos de la amplificación por PCR convencional. Para este método es necesario preparar un gel de agarosa al 1%. El primer paso es preparar el tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA), para ello se mezcla tris base, ácido acético y EDTA con agua destilada. El pH de la disolución debe encontrarse en torno a 8.

Una vez preparado, se disuelve 1 g de agarosa por cada 100 ml de TAE para obtener el gel al 1% de agarosa. Se calienta en un microondas para ayudar a disolver la agarosa y se añade el intercalante fluorescente, REDsafe ®.

Se monta la cubeta, se coloca el gel y se rellena con TAE. Se cargan los marcadores en un pocillo, y en el resto los productos de PCR. Para cargarlos se deben mezclar con el tampón de carga. El tampón de carga contiene azul de bromofenol para visualizar la muestra durante la carga y el frente de migración durante la electroforesis. Debe orientarse adecuadamente el gel de agarosa, situando las muestras en el polo distal al electrodo positivo de la cubeta ya que el ADN está cargado de forma negativa y migrará hacia este electrodo positivo.

Para poder observar las bandas con los productos de reacción de la PCR, se pasa el gel de la electroforesis a un transiluminador de luz ultravioleta. En función de las bandas observadas, se escogerán los cebadores de los genes para los que se haya producido una buena amplificación (banda claramente visible y en el tamaño molecular adecuado), y se utilizarán en experimentos posteriores de la medida de la expresión génica durante la infección por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*.

3.8. Aislamiento de conidios *B. cinerea*

El material empleado para el aislamiento de conidios en *B. cinerea* se recoge en la figura 13.



Figura 13. Material empleado para el aislamiento de conidios de *Botrytis cinerea*.

El aislamiento de conidios se lleva a cabo a partir de las placas de Petri con medio PDA en las que se hizo crecer *B. cinerea*. Se añaden 10 ml de agua destilada y autoclavada en la placa y una gota de tritón, un detergente para facilitar la resuspensión de los conidios (figura 14). Con una varilla de vidrio se frota la superficie de la placa para resuspender la masa fúngica (micelio), y los conidios, en el agua.



Figura 14. Antes y después de resuspender los conidios de *B. cinerea* en agua destilada.

Se recoge la suspensión de conidios y micelio de la placa con una pipeta y se trasvasa a un filtro de lana de vidrio que servirá para separar las hifas del hongo (micelio) de los conidios. La suspensión filtrada se centrifuga en tubos de vidrio para obtener los conidios y eliminar el tritón y sustancias de deshecho.

Se realizan dos centrifugaciones. La primera durante 5 min a 4.500 rpm, tras la cual se elimina el sobrenadante y se añaden 3 ml de agua destilada para resuspender los conidios. Se centrifuga una segunda vez y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspenden los conidios en 2

ml de agua destilada. Empleando una cámara de Neubauer se realiza un recuento de los conidios presentes la solución final. Para poder hacer el recuento primero se debe hacer una dilución 1:100, pues si no, como se observa en la figura 15, habría demasiados conidios para poder contarlos.

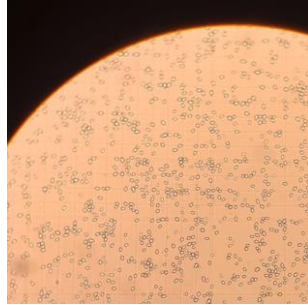


Figura 15. Solución de conidios sin diluir en cámara de Neubauer.

3.9. Inoculación de plántulas de tomate con *B. Cinerea*

A partir de la solución de conidios obtenida se calcula el volumen requerido para la inoculación empleando la fórmula: $V' = \frac{1 \text{ ml} \times 10^6 \frac{\text{conidios}}{\text{ml}}}{C'}$

En esta fórmula, V' representa el volumen requerido de la solución de conidios obtenida en el paso anterior; la concentración final de 10^6 conidios por ml que se quieren; 1 ml de volumen de la solución final; y C' la concentración de conidios medida en la cámara de Neubauer de la solución de conidios obtenida en el paso anterior.

El volumen calculado se introduce en un eppendorf y se enrasa hasta 1 ml con medio líquido PDB y se deja reposar entre 2-3 horas para que el medio ayude al crecimiento y germinación de los conidios. Transcurrido este tiempo, se inoculan las plántulas colocando ocho gotas de $2\mu\text{l}$ en cada uno de los lóbulos de las cuatro primeras hojas, como se muestra en la figura 16.



Figura 16. Lóbulo inoculado con 8 gotas de inóculo de *B. cinerea*. La imagen de la izquierda muestra el lóbulo recién inoculado (0h), y el de la derecha muestra el lóbulo inoculado a las 72 horas.

Las plantas de tomate se colocan en cámaras húmedas, figura 17, que consisten en cajas de plástico con agua y papel de filtro, que se coloca para aumentar la superficie de evaporación del agua ayudando a mantener unas condiciones de humedad elevada en el interior de la caja.

Las muestras son recogidas tras 0 horas de la inoculación (inmediatamente tras la inoculación) en el caso de la muestra control, y tras 16 horas tras la inoculación, coincidiendo con una infección temprana.

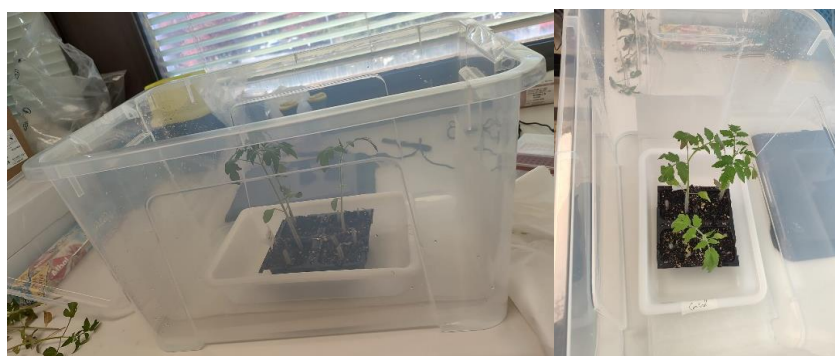


Figura 17. Cámara húmeda con plantas de tomate inoculadas.

3.10. Extracción de ARN

La recogida de muestras a las 0 y 16 horas tras la inoculación se realiza seccionando las hojas, congelándolas en nitrógeno líquido y almacenándolas a -20°C . La extracción de ARN se realiza usando el E.Z.N.A.® Plant RNA Kit según el protocolo del fabricante. En la figura 18 se recoge el material empleado. Este ARN será retrotranscrito a ADNc usando el kit qScript

cDNA Synthesis de Quantabio y se usará en una RT-qPCR para medir la expresión relativa de los genes de interés.

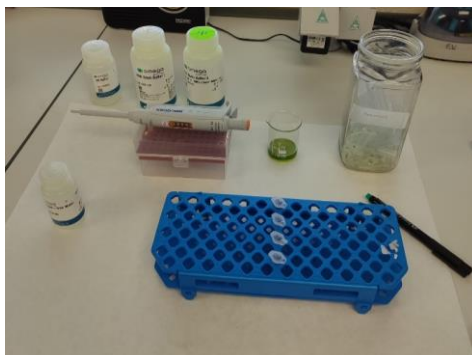


Figura 18. Material y disposición para la extracción de ARN de las muestras inoculadas.

A continuación se describen brevemente los pasos seguidos con el kit E.Z.N.A.® Plant RNA. El tejido congelado de las plantas inoculadas se introduce en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Es importante que el tejido no se descongele antes de añadir el primer buffer del procedimiento (RB buffer) pues al tratar con ARN se debe tener cuidado por ser este fácilmente degradable. El RB buffer se encargará de mantener un pH óptimo que facilite la extracción y liberación del ARN.

El siguiente paso consiste en hacer pasar la solución a través de una columna homogeneizadora mediante la centrifugación a 14.000g, eliminando restos celulares que no son de interés. Se añade un volumen de etanol 70% y se hace pasar por otra columna de unión de ARN mediante varias centrifugaciones.

A continuación, se procede con la etapa de lavado en la que, mediante el uso de varios tampones de lavado (Wash Buffer I y II), se elimina de la columna todo aquello que se haya podido unir que no sea ARN. Un último paso en esta fase consiste en centrifugar la columna vacía para eliminar trazas de etanol que se hayan podido adherir y que podrían interferir con posteriores métodos. Finalmente, se eluye el ARN empleando agua libre de nucleasas y se congela para su conservación.

3.11. Síntesis de cDNA

A partir del ARN extraído de las plantas inoculadas se realiza una retrotranscripción para obtener el ADNc. En este proceso se empleó el qScript® cDNA Synthesis Kit.

Para ello fue necesario el uso del ARN de las muestras (1 µg), agua libre de nucleasas, qScript Reaction Mix (5X) y qScript RT (retrotranscriptasa). El programa empleado consistió en tres ciclos. El primero de ellos se realizó a 22°C durante 5 minutos; el segundo a 42°C durante 45 minutos; y el último a 85°C durante 5 minutos.

3.12. RT-qPCR

La RT-qPCR se realizó empleando el ADNc obtenido a partir del ARN extraído de las plantas de tomate inoculadas con *B.cinerea* (HB16h), y del ARN de las plantas de tomate sin inocular (control).

El diseño de las placas se realizó teniendo en cuenta tres concentraciones de ADNc para cada muestra (100ng, 20ng y 4ng total por reacción). Para cada gen se midió la expresión de dos muestras provenientes de dos experimentos independientes. Para cada uno de estos experimentos independientes se midió una muestra 0hpi (0 horas post-inoculación, control, HB0h) y una muestra 16hpi (16 horas post-inoculación, HB16h).

Los reactivos empleados en la qPCR Real Time fueron el ADNc, los cebadores (*forward* y *reverse*) del gen del que se quiere estudiar la expresión, agua libre de nucleasas y PerfeCTa SYBR Green SuperMix de Quantabio, que se pipetearon en una placa opaca de 48 pocillos.

Con los resultados obtenidos se calculó la expresión relativa de los genes medidos empleando la fórmula de la figura 19.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Figura 19. Ecuación para el cálculo de la expresión relativa (ratio) de los genes estudiados (target) frente al gen constitutivo (ref) (Pfaffl, 2001).

La expresión relativa (ratio en la figura 19) se calcula normalizando los valores del gen estudiado frente a los de un gen constitutivo, que en este caso fue el de la tubulina para ambos organismos (*SITub* o *BcTub*). Para ello es necesario conocer los valores de eficiencia (E) y los ciclos umbrales (Ct) para cada muestra.

La eficiencia (E) se calcula con la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$. Es necesario conocer la pendiente de la recta resultante de correlacionar las tres concentraciones medidas (100ng, 20ng y 4ng) frente al ciclo umbral para cada concentración. El ciclo umbral (Ct) se define como aquel ciclo a partir del cual se produce amplificación, y coincide con el ciclo de amplificación en el que la fluorescencia medida supera el valor de fluorescencia de fondo (umbral) (Pfaffl, 2001).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Validación de los cebadores diseñados

Inicialmente se diseñaron cebadores para un total de 13 genes de *Botrytis cinerea* y 13 de *Solanum lycopersicum*. De estos genes, que fueron descritos como diferencialmente expresados durante la interacción *Solanum-Botrytis* (Quin et al., 2023), se acabaron empleando 6 en el estudio de la interacción huésped-patógeno. Esta elección se realizó utilizando PCR convencional sobre ADN puro de cada organismo, para comprobar la capacidad de los cebadores de amplificar el gen seleccionado. Posteriormente, se realizaron electroforesis con el producto de estas reacciones de polimerización para comprobar si se producía la amplificación esperada por tamaño de amplicón.

En la figura 20 se muestra una electroforesis con un primer pocillo que contiene los marcadores, cuyos tamaños de banda se recogen en la figura 21; un segundo pocillo con el

producto de PCR del gen *BcAct* (gen de la actina de *Botrytis*); y un tercero con el de *BcTub* (gen de la tubulina de *Botrytis*). En el pocillo del gen *BcAct* se observan dos bandas, una primera banda situada entre 500 y 700 pb y una segunda ligeramente por encima de los 300 pb, lo que no coincide con la longitud esperada (218 pb), razones por las cuales se descartará el uso de estos cebadores durante este trabajo. En cambio, en el pocillo del gen *BcTub* hay una única banda cuya longitud coincide con la esperada (125 pb), haciendo que este par de cebadores sean de interés para las posteriores PCR cuantitativas.

Debido a estos resultados, será el gen de *BcTub* el usado como gen constitutivo para *Botrytis cinerea* a lo largo de todo este trabajo experimental, mientras que el gen constitutivo para *Solanum lycopersicum* será *SlTub*, mostrado en la figura 22. Codificando cada gen para la tubulina respectiva de cada especie.

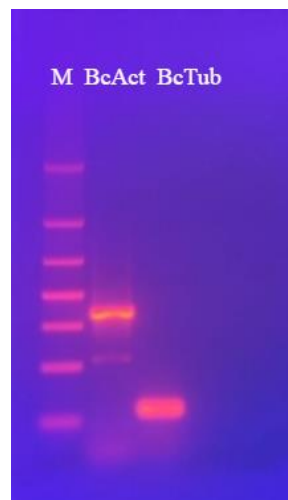


Figura 20. Bandas del producto de PCR para los genes constitutivos de referencia de *Botrytis cinerea*, *BcAct* (actina) y *BcTub* (tubulina).

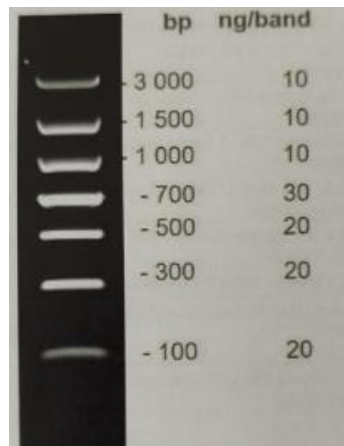


Figura 21. Tamaño de bandas de los marcadores moleculares empleados.

Las figuras 22 y 23 muestran que los genes que amplificaron de manera exitosa durante la PCR fueron *BcCazy1*, *BcCazy2*, *BcCazy3*, *BcCazy4*, *BcNep1*, *BcPg2*, *BcPg6*, *SIet1*, *SITub*, *SIDef*, *SIDcd2*, *SICas1*, *SICas3*, *SIet3*, *SIet4*, *SIPat* y *SIFlo*. De todos ellos se escogieron 8, tomando en consideración la intensidad de las bandas, factor que está directamente relacionada con la amplificación ya que, a mayor cantidad de producto de PCR, mayor amplificación. Además, también se tuvo en cuenta que el tamaño de la banda coincidiese con el esperado y que solo hubiese una banda. Los genes escogidos se muestran en las tablas 1 y 2.

Los Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy) son enzimas hidrolíticas que emplea *Botrytis* para degradar y poder penetrar la pared celular de las células del huésped. Por su parte, *BcPg6* es un tipo de cazymes ya que codifica para una enzima (Pg6) que degrada un tipo de azúcar que compone las pectinas, las cuales forman la pared celular. Además, *Botrytis cinerea* también dispone de genes que se expresan durante la interacción planta-patógeno para la producción de metabolitos secundarios tóxicos como el ácido botcínico (*BcBoa*) o el viridifloreño (*SIFlo*). Las defensinas (*SIDef*), por su parte, son proteínas con función antimicrobiana que inhibe el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras (Rojas et al., 2010). Los cebadores para estos genes fueron diseñados y mostraron amplificación en la PCR convencional, pero finalmente no se usaron.

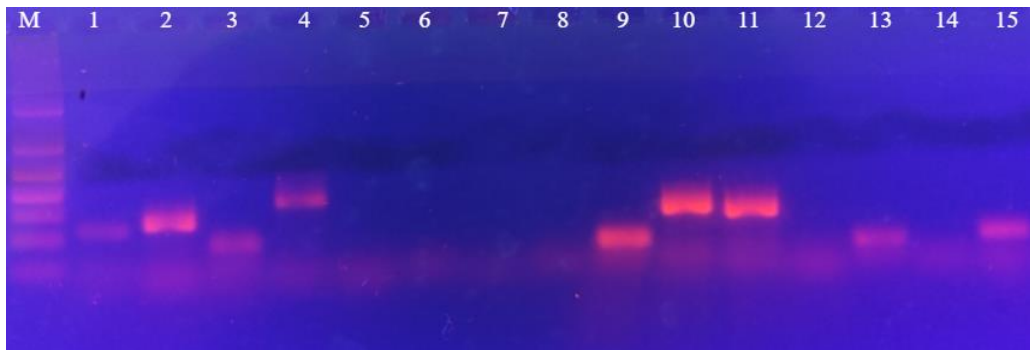


Figura 22. Electroforesis de genes de *B. cinerea* (Bc) y *Solanum lycopersicum* (Sl). *Bccazzy1* (1), *Bccazzy2* (2), *Bccazzy3* (3), *Bccazzy4* (4), *Bccazzy5* (5), *BcBoa4* (6), *BcBoa10* (7), *BcPgx1* (8), *BcNep1* (9), *BcPg2* (10), *BcPg6* (11), *SlCas2* (12), *SlEt1* (13), *SlEt2* (14), *SlTub* (15).

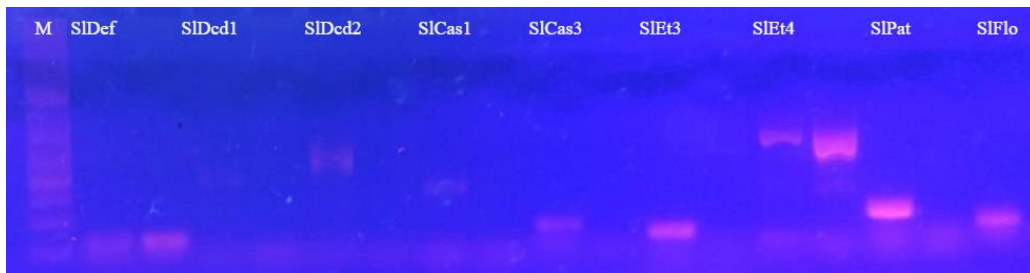


Figura 23. Electroforesis de genes de *B. cinerea* (Bc) y *Solanum lycopersicum* (Sl). *SIDef*, *SIDcd1*, *SIDcd2*, *SlCas1*, *SlCas3*, *SlEt3*, *SlEt4*, *SlPat*, *SlFlo*.

4.2. Medición de la expresión génica

La curva de *melting* se obtuvo durante la realización de la RT-qPCR. Esta curva se obtiene correlacionando la variación de fluorescencia con la variación de temperatura. La variación de fluorescencia se debe a la desnaturalización de la doble cadena de ADN, que es separada en dos hebras simples a temperaturas elevadas. La temperatura a la que se produce la desnaturalización depende de la longitud y composición en nucleótidos del amplicón, lo que permite estimar su tamaño molecular.

La curva obtenida para los genes estudiados (figura 24) proporciona información que permite comprobar que, efectivamente, los fragmentos obtenidos en la RT-qPCR corresponden

con los esperados tras la amplificación. Esta curva de melting es una muestra adicional de la especificidad de los cebadores durante la amplificación.

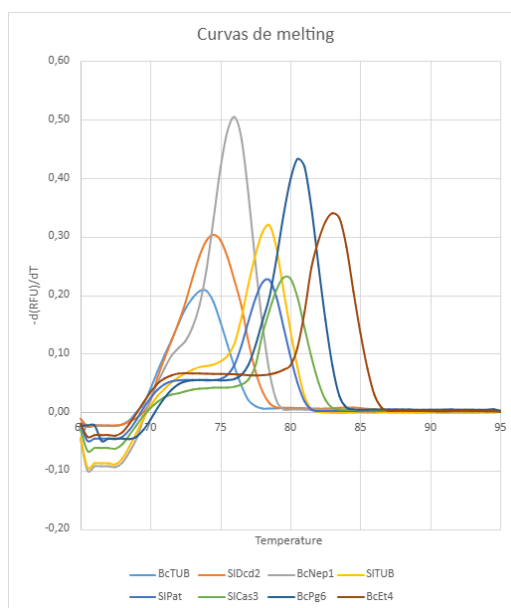


Figura 24. Curvas de melting para los genes *BcTub*, *BcNep1*, *BcPg6*, *SIEt4*, *SITub*, *SIDcd2*, *SIPat*, *SICas3*.

Los genes estudiados mediante RT-qPCR se dividen en dos grandes bloques, los genes implicados en la síntesis de enzimas hidrolíticas y fitotoxinas, y los genes implicados en la regulación de la muerte celular programada. Los resultados obtenidos para cada uno de estos genes se detallan a continuación y, en general, se observa que durante la interacción huésped-patógeno estudiada, pueden sobreexpresarse o reprimir su expresión en función de su implicación en la respuesta inmune de la planta o en el ataque del hongo. Estos datos corresponden a muestras recogidas a las 0 horas de la inoculación en el caso del control, y 16 horas tras la inoculación en el caso de las muestras a estudiar. Estos tiempos se corresponden con una infección temprana en la que aún no son visibles las lesiones en el tejido como las que se mostraban en la figura 16.

4.2.1. Enzimas hidrolíticas y fitotóxicas

En el ataque llevado a cabo por *Botrytis* y la defensa frente a este que realiza *Solanum*, tiene lugar la producción de sustancias fitotóxicas y enzimas líticas. El patógeno y el huésped tratan de degradarse mutuamente.

Para defenderse ante el ataque del patógeno, *Solanum* actúa sintetizando etileno, una fitohormona que activa los genes de defensa. En este proceso es importante *SlEt4*, un gen que codifica la ACC sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de esta fitohormona. La sobreexpresión de *SlEt4* puede causar un aumento de la síntesis de etileno. Los datos observados en la RT-qPCR (figura 25) muestran que los valores de expresión del gen *SlEt4* son 7,5 veces mayores que en la muestra control.

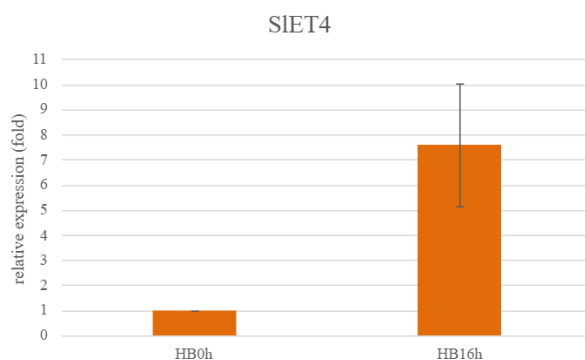


Figura 25. Expresión del gen *SlEt4*, siendo HB0h los niveles de expresión del control a tiempo 0h y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

Díaz et al. (2002) trataron plantas de tomate con un inhibidor de la percepción del etileno, provocando un aumento en la susceptibilidad de la planta frente a *Botrytis*. Otro de sus ensayos consistió en pretratar las plantas con etileno, observando una susceptibilidad reducida a *Botrytis*. Este pretratamiento con etileno activó procesos defensivos como la activación de genes relacionados con la patogénesis (PR). Entre las PR se encuentran enzimas hidrolíticas que atacan al patógeno, siendo una de ellas la proteína *patatin-like*. La expresión de *SIPat* (figura 26) se vio incrementada 170 veces respecto al valor del control.

Camera et al. (2005) observaron un aumento de los niveles de expresión de la proteína *patatin-like* (*SIPat*) en respuesta a infecciones por *Botrytis* en *Arabidopsis*, que cursó con un aumento de la susceptibilidad de la planta al patógeno.

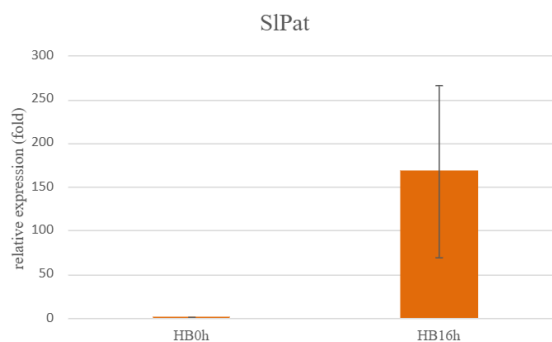


Figura 26. Expresión génica de *SIPat*, siendo HB0h los niveles de expresión del control a tiempo 0h y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

Botrytis, por su parte, produce enzimas hidrolíticas que atacan las células de *Solanum*. En este caso se estudió la expresión de *BcPg6*, un gen que codifica para la poligalacturonasa 6, encargada de degradar azúcares de la pared celular facilitando la penetración del hongo. Esta sobreexpresión se puede apreciar en la figura 27, que muestra un aumento de la expresión de 3,5 veces el valor medido de la muestra control.

En otros estudios se ha observado que una inhibición de endopoligalacturonasas en *Botrytis*, como la *BcPg2*, ha conducido a una disminución de la patogenicidad de *Botrytis* en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Joubert et al., 2007).

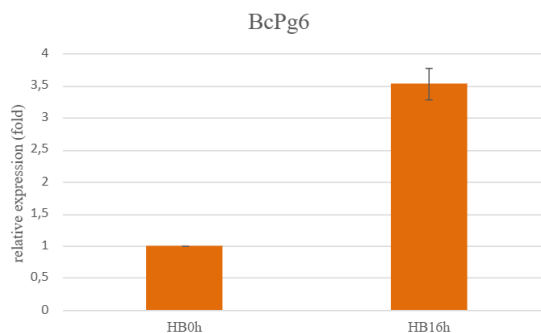


Figura 27. Expresión génica de *BcPg6*, siendo HB0h los niveles de expresión del control a tiempo 0h y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

Por otra parte, *BcNep1*, es una proteína producida por *Botrytis* durante la interacción planta-patógeno y que se ha relacionado con su virulencia (Schouten et al., 2008). NEP1 tiene una doble función, es una proteína fitotóxica para el huésped, y además actúa como regulador de la muerte celular programada. A día de hoy se desconoce cuál de los dos papeles es predominante, o si ambos son necesarios para su función (Gijzen & Nürnberger, 2006). En este trabajo se ha observado un aumento de la expresión de 2,5 veces el valor de la muestra control (figura 28). Qutob et al. (2002) midieron la expresión génica de NEP1 viendo que hasta las 12 horas post-inoculación no está presente en niveles detectables en *Phytophthora sojae*, y que el aumento de su transcripción coincide con el paso de la etapa biotrofa de este patógeno a la necrotrofa.

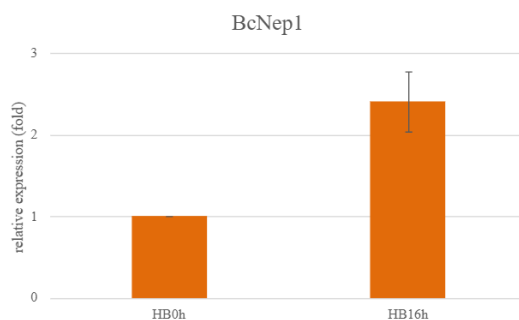


Figura 28. Expresión génica *BcNep1*, siendo HB0h los niveles de expresión del control a tiempo 0h y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

4.2.2. Regulación de la muerte celular programada

BcNep1, con su doble función, muestra que tiene tanta importancia en el proceso de invasión la producción de enzimas líticas y tóxicos, como la regulación de la muerte celular programada. Este gen actúa como inductor de la muerte celular apoptótica, aunque su presencia

no implica que esté ocurriendo un proceso de muerte celular en las células del huésped. Para determinar si están teniendo lugar procesos de muerte celular, y el tipo (apoptótica o autofágica), se debe medir la expresión de genes de la planta que actuarán, en este caso, como marcadores. En este trabajo se estudió la expresión de *SlCas3* (apoptosis) y *SlDcd2* (autofagia). Si bien no son los únicos genes que actúan en estos procesos, se ha demostrado que su expresión es indicativa de que se está realizando la muerte celular a la que están asociadas.

Las caspasas, o metacaspasas en el caso de las plantas, están implicadas en el proceso de muerte celular por apoptosis. Durante este ensayo se ha observado un aumento de su expresión de 6 veces el valor del control (figura 29). Esto es indicativo de que se está produciendo la muerte por apoptosis en las células de *Solanum*. En estudios previos se ha observado también un aumento de los niveles de ARNm de un gen de metacaspasa (LeMCA1) en hojas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea*. Este fenómeno de apoptosis se relaciona con una mayor susceptibilidad al patógeno (Hoeberichts, 2003).

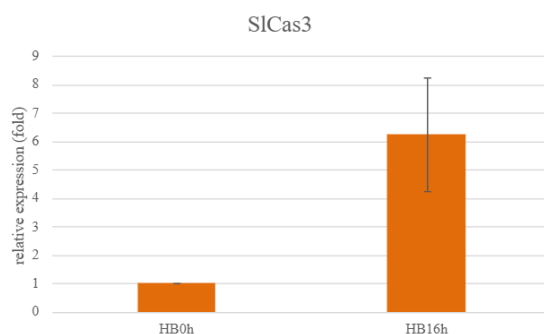


Figura 29. Expresión génica de *SlCas3*, siendo HB0h los niveles de expresión del control a tiempo 0h y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

Como se ha estado comentando, para el proceso de infección por este patógeno es beneficioso que se produzca apoptosis en las células del huésped. Las muestras empleadas para el análisis de la expresión pertenecen a plantas susceptibles que desarrollarán los síntomas de la infección, el tejido necrótico que se muestra en la figura 16. Por tanto, es congruente el aumento de expresión observado en la figura 29. Los procesos de apoptosis y autofagia en la

muerte celular programada son antagónicos, la activación de uno inhibe al otro. Por tanto, es esperable que en plantas susceptibles se observe una represión en la expresión de los genes relacionados con la autofagia.

SIDcd2 codifica para proteínas con el dominio Dcd, que están implicadas en procesos de desarrollo de la planta y activación de una respuesta similar a la hipersensible (HR). En caso de que se inhiba la expresión de Dcd2, se inhibe la respuesta similar a la HR, que es paralela a la muerte celular por autofagia. En la figura 30 se observa una disminución de la expresión de *SIDcd2* respecto a los valores de la muestra control extraída a las 0h de la inoculación. Lai et al. (2011) estudiaron el papel de la autofagia en la susceptibilidad de plantas a patógenos necrotróficos, viendo en *Arabidopsis* que mutantes incapaces de realizar la muerte celular autofágica eran muy susceptibles a patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea*. De esta forma demostraron el papel de la autofagia en la resistencia de las plantas ante estos patógeno.



Figura 30. Expresión génica de *SIDcd2*, siendo HB0h los niveles de expresión basales y HB16h tras 16h de la inoculación. Las barras de error indican el error estándar de dos experimentos independientes.

5. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se diseñaron 26 cebadores. De todos ellos se validaron un total de 8 para su uso: 6 para el estudio de genes implicados en la interacción *Botrytis-Solanum* (*BcNep1*, *BcPg6*, *SIEt4*, *SIPat*, *SICas3*, *SIDcd2*), y 2 para los genes constitutivos de referencia de la tubulina (*SITub*, *BcTub*).

Se cultivaron exitosamente plántulas de tomate que fueron inoculadas con el patógeno *B. cinerea* obteniendo muestras infectadas para su estudio.

En genes indicativos de la síntesis de enzimas líticas y tóxicos, se observó sobreexpresión. Un aumento en la presencia de ARNm de la poligalacturonasa 6 (*BcPg6*) de *Botrytis*, enzima encargada de romper las paredes de *Solanum*; y un aumento en la presencia de ACC sintasa (*SIEt4*), de forma que se produce etileno en la planta como método de defensa. En genes indicativos de la activación de defensas de la planta se produjo un aumento en la expresión de *SIPat*, que codifica para la proteína *patatin-like*, una proteína relacionada con la patogénesis (PR). En cuanto a genes indicativos de la expresión de genes de virulencia implicados en la progresión de la colonización del patógeno, se observó un aumento en la expresión de *BcNep1*.

En genes indicativos de la muerte celular programada se observó un aumento en la expresión de *SICas3*, relacionado con la apoptosis; y una supresión de la expresión de *SIDcd2*, gen relacionado con la muerte celular autofágica. El balance de muerte celular programada se inclina hacia la apoptosis en plantas susceptibles, lo que es favorable a la progresión de la enfermedad, hecho reflejado en la aparición de necrosis en el huésped. Hemos de recordar que este huésped es susceptible y que, a pesar de que se activan mecanismos de inmunidad, no son suficientes para detener el avance del patógeno

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. In *Trends in Plant Science* (Vol. 28, Issue 2, pp. 211–222). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>
- Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología / Argentinean Journal of Microbiology*, 52(3), 245–255. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2020.04.006>
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., & Low, P. S. (2000). Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *The Plant Cell*, 12(11), 2191–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2191>
- Coll, N. S., Smidler, A., Puigvert, M., Popa, C., Valls, M., & Dangl, J. L. (2014). The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: Functional linkage with autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.50>
- Díaz, J., ten Have, A., & van Kan, J. A. L. (2002). The Role of Ethylene and Wound Signaling in Resistance of Tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 129(3), 1341–1351. <https://doi.org/10.1104/pp.001453>
- FAOSTAT. (2025). <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Gijzen, M., & Nürnberger, T. (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, 67(16), 1800–1807. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.008>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Grienenberger, E., Geoffroy, P., Mutterer, J., Legrand, M. y Heitz, T. (2010). La interacción de las lípido acil hidrolasas en la defensa inducible de las plantas. *Plant Signaling & Behavior*, 5(10), 1181–1186. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12800>
- Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR : A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>
- Hoerberichts, F. A., Ten Have, A., & Woltering, E. J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*, 217(3), 517–522. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1049-9>

- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H. T., Mattsson, O., Jørgensen, L. B., Jones, J. D. G., Mundy, J., & Petersen, M. (2009). Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in Arabidopsis. *Cell*, *137*(4), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.036>
- Joubert, D. A., Kars, I., Wagemakers, L., Bergmann, C., Kemp, G., Vivier, M. A., & van Kan, J. A. (2007). A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for in vitro interaction. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, *20*(4), 392–402. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0392>
- Kabbage, M., Williams, B., & Dickman, M. B. (2013). Cell Death Control: The Interplay of Apoptosis and Autophagy in the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, *9*(4), e1003287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003287>
- La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M., & Heitz, T. (2005). A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. *Plant Journal*, *44*(5), 810–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02578.x>
- Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, *66*(6), 953–968. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04553.x>
- Li, Z., & Ahammed, G. J. (2023). Salicylic acid and jasmonic acid in elevated CO₂-induced plant defense response to pathogens. *Journal of Plant Physiology*, *286*, 154019. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154019>
- Liyao Su, Tian Zhang, Bin Yang, Yibo Bai, Wanping Fang, Jingsong Xiong, Zong-Ming (Max) Cheng, El efector de *Botrytis cinerea* BcXYG1 suprime la inmunidad en *Fragaria vesca* al apuntar a FvBPL4 y FvACD11, Horticulture Research , Volumen 11, Número 1, enero de 2024, uhad251. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad251>
- Park, C., Lee, H. Y., & Yoon, G. M. (2021). The regulation of ACC synthase protein turnover: a rapid route for modulating plant development and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *63*, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102046>
- Pečenková, T., Sabol, P., Kulich, I., Ortmannová, J., & Žárský, V. (2016). Constitutive Negative Regulation of R Proteins in Arabidopsis also via Autophagy Related Pathway? *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00260>
- Pemberton, C. L., & Salmond, G. P. C. (2004). The Nep1-like proteins—a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*, *5*(4), 353–359. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00235.x>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 308–316). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>

- Qin, S., Veloso, J., Baak, M., Boogmans, B., Bosman, T., Puccetti, G., Shi-Kunne, X., Smit, S., Grant-Downton, R., Leisen, T., Hahn, M., & van Kan, J. A. L. (2023). Molecular characterization reveals no functional evidence for naturally occurring cross-kingdom RNA interference in the early stages of *Botrytis cinerea* –tomato interaction. *Molecular Plant Pathology*, 24(1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.13269>
- Qutob, D., Kamoun, S., & Gijzen, M. (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal*, 32(3), 361–373. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01439.X>
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *botrytis cinerea*. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>
- Rojas Arias, Adriana Carolina, & Zamora Espitia, Humberto Miguel. (2010). Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 33-46. Retrieved June 22, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000300003&lng=en&tlng=es.
- Schouten, A., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. L. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist*, 177(2), 493–505. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02274.x>
- Shutterstock. (2025). Shutterstock. <https://www.shutterstock.com/es/search/botrytis?consentChanged=true>
- Tenhaken, R., Doerks, T., & Bork, P. (2005). DCD - A novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinformatics*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-169>
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>
- Veloso, J., García, T., Bernal, A. et al. Nuevas bases para la resistencia inducida: receptores de ácido salicílico y cebado transgeneracional. *Eur J Plant Pathol* 138 , 685–693 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0350-0>
- Veloso, J., & van Kan, J. A. L. (2018). Many Shades of Grey in *Botrytis*–Host Plant Interactions. *Trends in Plant Science*, 23(7), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.016>
- Yagyu, M., & Yoshimoto, K. (2024). New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 75(5), 1234–1251. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad459>
- Yu, W., Yu, M., Zhao, R., Sheng, J., Li, Y., & Shen, L. (2019). Ethylene Perception Is Associated with Methyl-Jasmonate-Mediated Immune Response against *Botrytis cinerea* in Tomato Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(24), 6725–6735. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B02135/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2019-02135H_0006.GIF

Zhang, B., Shao, L., Wang, J., Zhang, Y., Guo, X., Peng, Y., ... Lai, Z. (2020). Phosphorylation of ATG18a by BAK1 suppresses autophagy and attenuates plant resistance against necrotrophic pathogens. *Autophagy*, 17(9), 2093–2110. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1810426>