

Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas.

Francisco Javier Fernández Acero

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz

Directores: Jesús Manuel Cantoral Fernández, Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera. Universidad de Cádiz, junio 2006

La proteómica es una de las tecnologías que mayor interés está despertando en los últimos años. Son numerosos los estudios realizados en distintos microorganismos, pero aún son escasos los estudios realizados en hongos filamentosos. Por este motivo nos propusimos realizar una aproximación al proteoma de *Botrytis cinerea*, uno de los hongos fitopatógenos más importantes ya que afecta a una gran variedad de cultivos, en cualquier órgano de la planta y en cualquier estadio de desarrollo.

En primer lugar se llevó a cabo la optimización del protocolo para la obtención y estudio del proteoma de *B. cinerea* con el objetivo de determinar un perfil proteómico de referencia que nos permitiera: i) caracterizar las proteínas mayoritarias presentes en el hongo en condiciones de cultivo estándar, ii) determinar si alguna de estas proteínas están relacionadas con la patogenicidad y, iii) buscar aquellas proteínas susceptibles de convertirse en dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fungicidas. Para ello se compararon distintos protocolos de extracción y solubilización. La solubilización de proteínas en tampón fosfato y posterior precipitación mediante acetona y ácido tricloroacético resultó ser el mejor de los métodos ensayados. Los geles 2-DE teñidos con Comassie revelaron entre 380-400 especies proteicas ("spots"), comprendidas entre los 14 y 85 kDa y entre 5,4 y 7,7 de pI. Se seleccionaron 22 para su identificación, mediante MALDI-TOF o ESI-Trampa iónica. Entre estas proteínas se encontraron distintas formas de malato deshidrogenasa (MDH) y gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GADPH).

En segundo lugar se realizó un estudio de proteómica de expresión diferencial, comparando el proteoma de dos cepas de *B. cinerea* con distinta virulencia. Los extractos proteicos fueron analizados mediante 2-DE, revelándose diferencias cuantitativas y cualitativas entre los perfiles proteicos de ambas cepas. Se identificaron 27 especies, 17 de las cuales fueron identificadas como MDH, todas ellas específicas o sobreexpresadas en la cepa más virulenta, lo que indicaría el posible papel de dichas enzimas en los procesos infectivos. La GADPH también es expresada de forma específica en la cepa más virulenta. Además se identificaron otras proteínas de interés como la ciclofilina o el factor transcripcional metE/metH. La diferencia de expresión proteica entre cepas pueden adscribirse a las diferencias de virulencia entre las cepas.

El trabajo incluyó un estudio sobre la eficacia de 7 nuevos fungicidas racionales contra dos especies de *Phytophthora* spp. para determinar la eficacia de estos compuestos y ampliar su espectro de actuación. En general, todos estos compuestos demostraron su actividad fungistática, con porcentajes de inhibición del crecimiento por encima del 46% a 100 ppm. Estos datos indicarían un buen comportamiento de estos compuestos a escala terapéutica.

Las tres partes de las que consta esta Tesis Doctoral se han materializado en tres publicaciones: *Proteomics* (Fernández-Acero et al, 2006, S6, 88-96), *Archives of Microbiology* (Fernández-Acero et al, 2006, DOI 10.1007/s00203-006-0188-3) y *Journal of Phytopathology* (Fernández-Acero et al, 2006, 154, 1-6).