



FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

ÁREA: GENÉTICA

INSTITUTO HISPANO-LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Las funciones de FTF2 en *Fusarium oxysporum*

TESIS DOCTORAL

-Virginia Casado del Castillo-

Dirigido por:

Dr. José María Díaz Mínguez

Salamanca, 2017



FACULTY OF BIOLOGY

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND GENETICS

AREA: GENETICS

SPANISH-PORTUGUESE AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE

The roles of FTF2 in *Fusarium oxysporum*

PhD. THESIS

-Virginia Casado del Castillo-

Supervised by:

Dr. José María Díaz Mínguez

Salamanca, 2017

Dr. D. Luis Román Fernández Lago, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada "**Las funciones de FTF2 en *Fusarium oxysporum***", ha sido realizada en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca por **Dña. Virginia Casado del Castillo**, bajo la dirección del **Prof. Dr. José María Díaz Mínguez** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 27 de enero de 2017.

Fdo: Dr. D. Luis Román Fernández Lago

D. José María Díaz Mínguez, Profesor Titular, acreditado Catedrático, del Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**Las funciones de FTF2 en *Fusarium oxysporum***”, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo mi dirección, por **Dña. Virginia Casado del Castillo**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 27 de enero de 2017.

Fdo: Dr. D. José María Díaz Mínguez

Fdo: Dña. Virginia Casado del Castillo

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio 1 del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor Dr. José María Díaz Mínguez. Durante el desarrollo de la Tesis he disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Dentro del programa FPU realicé dos Estancias Breves que complementaron el trabajo presentado en esta Tesis, la primera en el laboratorio del Prof. Michael H. Perlin en la Universidad de Louisville (Kentucky, Estados Unidos de América) y la segunda en el laboratorio del Prof. Dov Prusky en el Volcani Center (Agricultural Research Organization, ARO, en Bet Dagan, Israel).

Publicaciones científicas relacionadas con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y otros trabajos publicados durante el período de formación predoctoral:

- de Vega-Bartol, J.J. de, Tello, V., Niño-Sánchez, J., **Casado-del Castillo, V.** and Díaz-Mínguez, J.M. (2013). Quantitative PCR analysis of double-stranded RNA-mediated gene silencing in fungi. In *Laboratory protocols in fungal biology*. (Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., and O'Donovan, A., eds). New York, NY: Springer New York, pp. 279–287.
- Niño-Sánchez, J., Tello, V., **Casado-del Castillo, V.**, Thon, M.R., Benito, E.P., and Díaz-Mínguez, J.M. (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* **6**.
- Niño-Sánchez, J., **Casado-Del Castillo, V.**, Tello, V., de Vega-Bartol, J.J., Ramos, B., Sukno, S.A., and Díaz Mínguez, J.M. (2016). The *FTF* gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1124–1139.
- Bi, F., Barad, S., Ment, D., Luria, N., Dubey, A., **Casado, V.**, Glam, N., Mínguez, J.D., Espeso, E.A., Fluhr, R., Prusky, D. (2016). Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1178–1195.

«Sergol y Elonio eran dos amigos que compartían una afición común: ambos eran grandes observadores de todo lo que sucedía a su alrededor. Les encantaba quedar de vez en cuando para debatir posturas, analizar hechos y darle la vuelta a cualquier dogma o creencia establecida.

Los dos amigos eran capaces de pasar así tardes e incluso noches enteras, pues disfrutaban enormemente de este tipo de debates independientemente de sus posturas al respecto.

Un día, estando sentados bajo un gran árbol, comenzó a soplar una ligera brisa. En ese momento uno de ellos dijo:

-Sabes, Sergol, aunque parezca algo obvio, he llegado a la conclusión de que es el viento el que mueve las ramas de los árboles.

-Pero, Elonio, no seas ignorante, esa es la creencia popular, pero si investigas un poco más, te darás cuenta de que en realidad son las ramas de los árboles las que mueven el viento.

-Pero... qué tonterías dices, eso es imposible, todo el mundo sabe que es al contrario, que el viento mueve las ramas, las aspas de los molinos, las hojas, las cometas...

-Todo el mundo, todo el mundo... también todo el mundo pensaba que la tierra era plana...

En ese momento, un anciano que había estado escuchando la conversación les dijo:

-Ahora mismo no sé si es el viento el que mueve las ramas o son las ramas las que mueven el viento, pero al escucharos me he dado cuenta de que son las mentes lo único capaz de mover el mundo. >>

Las ramas mueven el viento. "Cuentos para entender el mundo" (Eloy Moreno)

A mis padres

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICES	
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	X
RESUMEN / SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	12
Los hongos fitopatógenos	12
El género <i>Fusarium</i>	14
○ Taxonomía	15
○ Morfología	17
○ Reproducción	19
○ Tipos de patógenos	20
<i>Fusarium oxysporum</i>: fitopatógeno vascular	21
○ Morfología	22
○ Proceso de infección	23
○ Especificidad patógeno – hospedador: las formas especiales	26
○ Bases genéticas de la patogenicidad de <i>F. oxysporum</i>	27
Genes conservados en el género <i>Fusarium</i>	27
Genes específicos de <i>F. oxysporum</i>	29
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	37
○ Importancia de la fusariosis vascular en la judía de El Barco de Ávila	39
Las interacciones planta-patógeno	42
○ Respuesta defensiva de la planta frente a <i>F. oxysporum</i>	42
Mecanismos de defensa constitutivos	43
Mecanismos de defensa inducibles	43
○ Estrategias de los hongos fitopatógenos en la infección: <i>F. oxysporum</i> frente a su hospedador	51

OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS	55
Organismos	55
Medios y condiciones de cultivo	56
Ensayos de germinación	60
Ensayos de esporulación	61
Ensayos de crecimiento saprofito	61
Ensayos de infección en planta y cuantificación de síntomas	62
○ Ensayos en invernadero	62
○ Ensayos en medio hidropónico en cámara de germinación	65
Medida de la concentración de amonio	65
Medida de la concentración de ácido glucónico	66
Análisis microscópicos	67
Obtención de ácidos nucleicos	68
○ ADN genómico de hongo y planta	68
○ ADN plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	73
○ ARN total	74
○ Cuantificación de ácidos nucleicos	76
Vectores de clonación	76
Manipulación de ácidos nucleicos	78
○ Tratamiento con enzimas de restricción	78
○ Desfosforilación con fosfatasa alcalina	79
○ Ligaciones	79
Clonación USER™ <i>Friendly</i>	79
Ligación con ADN ligasa T4	81
Electroforesis	81
○ Electroforesis lineal de ADN	81
○ Electroforesis de ARN	82
Recuperación de fragmentos de ADN desde gel	83

Transformaciones	84
○ Transformaciones bacterianas	84
Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	84
Transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante electroporación	85
○ Transformaciones fúngicas: Transformación de <i>Fusarium oxysporum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> (ATMT)	86
Reacciones en cadena de la polimerasa	88
○ Reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR)	88
○ Transcripción inversa (RT-PCR). Síntesis de ADNc	91
○ PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	92
Hibridaciones de ADN. Hibridación tipo <i>Southern blot</i>	96
○ Hibridación de ADN digerido con enzimas de restricción	97
Análisis transcriptómicos	101
Secuenciación de ADN	103
○ Secuenciación de fragmentos de ADN	103
○ Secuenciación de genomas de hongo	103
Programas informáticos y bases de datos	104
CAPÍTULO I	
Regulación por carbono de la modulación de pH ambiental inducida por el metabolismo de hongos fitopatógenos	
INTRODUCCIÓN	107
RESULTADOS	109
DISCUSIÓN	119
CAPÍTULO II	
FTF2, factor de virulencia en <i>Fusarium oxysporum</i>	
INTRODUCCIÓN	125
RESULTADOS	129
DISCUSIÓN	193
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	202

APÉNDICES	204
REFERENCIAS	211

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Síntomas de fusariosis en diferentes hospedadores vegetales.	15
Figura 2. Colonias de especies del género <i>Fusarium</i> : variabilidad en tipo y coloración de colonia.	18
Figura 3. Tipos de esporas del complejo de especies <i>F. oxysporum</i> .	23
Figura 4. Ciclo de infección de <i>F. oxysporum</i> .	24
Figura 5. Representación esquemática de las interacciones entre las proteínas Avr e I en la interacción <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> – tomate.	31
Figura 6. Comparación sintomática en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	38
Figura 7. Funciones de las especies reactivas de oxígeno en la respuesta defensiva frente a patógenos.	47
Figura 8. Red de vías de transducción de señales implicadas en la respuesta defensiva de <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .	50
Figura 9. Mapa circular del vector de clonación pGEM®-T-Easy.	77
Figura 10. Mapa circular del vector de clonación pRF-HU2.	78
Figura 11. Estrategia de clonación USER™ <i>Friendly</i> para la obtención de un vector de reemplazamiento génico en un único paso.	80
Figura 12. Curva de amplificación en PCR cuantitativa.	94
Figura 13. Unidad de transferencia en las hibridaciones de ADN.	99
Figura 14. Efecto de la concentración de la fuente de carbono del medio de cultivo en la evolución del pH en cultivos <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	110
Figura 15. Efecto de la concentración de la fuente de carbono del medio de cultivo en la secreción de amonio y ácido glucónico en cultivos <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	111
Figura 16. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión <i>in vitro</i> del gen <i>PacC</i> de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	113
Figura 17. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión <i>in vitro</i> de “genes ácidos” de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	116
Figura 18. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión <i>in vitro</i> de “genes alcalinos” de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	118
Figura 19. Modelo de interacción entre los elementos que modulan la capacidad patogénica en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	122

Figura 20. Similitud genética entre los homólogos de <i>FTF2</i> (<i>Fusarium Transcription Factor 2</i>) en diferentes especies de hongos.	126
Figura 21. Localización de ORFs en el entorno genómico cercano a <i>FTF2</i> en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .	128
Figura 22. Alineamiento <i>BLASTN</i> de la región genómica donde se localiza el gen <i>FTF2</i> en diferentes especies de hongos fitopatógenos.	128
Figura 23. Modelos tridimensionales para los dominios dedo de zinc binuclear y MHR predichos por el servidor de reconocimiento de proteínas <i>Phyre2</i> para las proteínas <i>FTF2</i> , <i>FTF1</i> y <i>Gal4</i> .	131
Figura 24. Secuencia aminoacídica que conforma el dominio MHR en los factores de transcripción <i>FTF</i> en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	132
Figura 25. Esquema representativo de la localización de las regiones seleccionadas para el diseño del plásmido utilizado en la interrupción génica de <i>FTF2</i> .	133
Figura 26. Análisis mediante digestión enzimática y reacciones de PCR del clon de <i>E. coli</i> transformado con el plásmido <i>pFTF2-KO</i> . Esquema del plásmido <i>pFTF2-KO</i> (7.947 pb) obtenido tras una clonación dirigida <i>USERTM Friendly</i> .	135
Figura 27. Análisis mediante reacciones de PCR de clones de <i>A. tumefaciens</i> transformados con el plásmido <i>pFTF2-KO</i> .	136
Figura 28. Estrategia de reemplazamiento génico de <i>FTF2</i> mediante un doble evento de recombinación homóloga entre las regiones cercanas a los extremos 5' y 3' de <i>FTF2</i> presentes en la copia genómica del alelo silvestre del gen y las del alelo mutante.	137
Figura 29. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes candidatos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1.	138
Figura 30. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes candidatos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4.	138
Figura 31. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes monoconídicos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1.	140
Figura 32. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes monoconídicos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4.	141
Figura 33. Localización de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción <i>HindIII</i> y del lugar de hibridación de sondas en la secuencia del alelo silvestre y el mutante del gen <i>FTF2</i> .	143
Figura 34. Análisis mediante hibridación tipo <i>Southern blot</i> de los transformantes monoconídicos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1.	144

Figura 35. Localización de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción <i>Bam</i> HI en la secuencia del alelo silvestre y el mutante del gen <i>FTF2</i> .	146
Figura 36. Análisis mediante hibridación tipo <i>Southern blot</i> de los transformantes monoconídicos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4.	147
Figura 37. Tasa de germinación de estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> .	149
Figura 38. Tasa de esporulación de estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> .	150
Figura 39. Tasa de esporulación de estirpes FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> .	151
Figura 40. Microconidios de estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> recogidos durante los ensayos de esporulación.	152
Figura 41. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> en medio PDA.	154
Figura 42. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> en medio mínimo con fuente de carbono al 3%.	156
Figura 43. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> en medio mínimo con fuente de carbono al 0,3%.	157
Figura 44. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.	159
Figura 45. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> en medio mínimo ajustado a diferentes pH.	161
Figura 46. Formación de esporas de tipo macroconidio por las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> durante el crecimiento saprofítico en medio sólido.	163
Figura 47. Formación de esporas de tipo macroconidio por las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> durante el crecimiento saprofítico en medio sólido.	164
Figura 48. Ensayo de hidrofobicidad del micelio en colonias en desarrollo de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> .	165
Figura 49. Ensayo de hidrofobicidad del micelio en colonias en desarrollo de las estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> y FOP-SP4 Δ <i>FTF2</i> .	166
Figura 50. Fusariosis vascular en plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inducida por estirpes FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> .	170
Figura 51. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> a 1 dpi.	173
Figura 52. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ <i>FTF2</i> a 2 dpi.	174

Figura 53. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 3 dpi.	175
Figura 54. Colonización del cuello de raíz de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 5 dpi.	176
Figura 55. Colonización del cuello de raíz de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 7 dpi.	177
Figura 56. Colonización del hipocotilo de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 14 dpi.	178
Figura 57. Colonización del hipocotilo de plantas de judía (<i>P. vulgaris</i> L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 21 dpi.	179
Figura 58. Cuantificación de biomasa fúngica en plantas de <i>P. vulgaris</i> L. inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 y la estirpe mutante FOP-SP1 Δ FTF2.	180
Figura 59. Análisis de expresión por RT-qPCR de genes de judía involucrados en la respuesta defensiva de plantas colonizadas por la estirpe silvestre FOP-SP1 y la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2.	182
Figura 60. Análisis de expresión por RT-qPCR de <i>loci</i> candidatos a estar regulados por el factor de transcripción FTF2 en estirpes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	186
Figura 61. Análisis de expresión por RT-qPCR de genes presumiblemente regulados por FTF2 en plantas colonizadas por las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP1 Δ FTF2.	188
Figura 62. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes <i>SIX1</i> y <i>SIX6</i> en plantas colonizadas por las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2.	190
Figura 63. Análisis de expresión por RT-qPCR de <i>PacC</i> en plantas colonizadas por las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP1 Δ FTF2.	191
Figura 64. Modelo de regulación del reconocimiento de <i>F. oxysporum</i> por el hospedador con participación de FTF2.	200
Figura 65. Modelo de regulación de efectores de colonización vascular (VCE) en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> por la familia de factores de transcripción FTF.	201

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunas formas especiales representativas del complejo de especies <i>Fusarium oxysporum</i> con sus hospedadores correspondientes.	27
Tabla 2. Localización cromosómica de los miembros de las familias génicas <i>FOW2</i> , <i>EBR</i> y <i>FTF</i> en la estirpe 4287 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .	36
Tabla 3. Información de la estructura genómica de las formas especiales de <i>F. oxysporum</i> secuenciadas y depositadas en el proyecto <i>Broad Institute</i> .	37
Tabla 4. Estudio de la resistencia / susceptibilidad de variedades diferenciales de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. frente a las razas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	39
Tabla 5. Estirpes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> utilizadas en el trabajo.	55
Tabla 6. Composición de los medios de cultivo utilizados en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> .	58
Tabla 7. Escala CIAT.	63
Tabla 8. Composición de los medios utilizados durante la transformación de <i>F. oxysporum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> .	88
Tabla 9. “Genes ácidos” y “genes alcalinos” homólogos de <i>C. gloeosporioides</i> en la estirpe 4287 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .	114
Tabla 10. Listado de cebadores utilizados (Apéndice I).	204
Tabla 11. <i>Loci</i> presumiblemente regulados por <i>FTF2</i> (Apéndice II).	209

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
a.C.	Antes de Cristo
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADNr	ADN ribosómico
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN / RNA	Ácido ribonucleico / <i>Ribonucleic acid</i>
ARNasa	Ribonucleasa
ARS	<i>Agricultural Research Service</i> (Servicio de Investigación Agrícola)
ATP	Adenosín trifosfato
AVR / Avr	<i>Avirulence protein</i> (Proteína de avirulencia)
C	Citosina
°C	Grado Celsius
CDP-Star	2-cloro-5-(4-metoxipiro (1,2-diosietano-3,2'-(5' cloro) triclo[3.3.1.1.3.7] decan)-4il)-1-fenilfosfato disódico
cm	Centímetro
Ct	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo umbral)
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CWDE	<i>Cell Wall Degrading Enzyme</i> (Enzima degradadora de pared celular)
Cys	Cisteína
DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i> (Patrón molecular asociado a daño)
DEB	<i>DNA Extraction Buffer</i> (Tampón para extracción de ADN)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina-11-dUTP
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
dpi	Días post-inoculación

DPR	<i>Disease Progression Rate</i> (Índice de progresión de la enfermedad)
DTT	Ditiotreitol
dUTP	2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
Ect	Ectópico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ET	Etileno
<i>et al.</i>	<i>Et alli</i> (Y colaboradores)
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i> (Inmunidad Desencadenada por Efectores)
ETS	<i>Effector Triggered Susceptibility</i> (Susceptibilidad Desencadenada por Efectores)
f. sp. / ff. spp.	<i>Forma specialis / Formae speciales</i> (Forma/s especial/es)
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FOP-SP	<i>Fusarium oxysporum - Spain</i>
FOSC	<i>Fusarium oxysporum Species Complex</i> (Complejo de especies <i>Fusarium oxysporum</i>)
FWD / Fwd	<i>Forward</i>
g	Gramo
G	Guanina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
GLA	<i>Gluconic Acid</i> (Ácido glucónico)
hpi	Horas post-inoculación
HR	<i>Hypersensitive Response</i> (Respuesta hipersensible)
HV	<i>Highly virulent</i> (Muy virulento)
IGP	Indicación Geográfica Protegida
IGS	<i>Intergenic Spacer</i> (Región espaciadora intergénica)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciador intergénico transcrito)
JA	Ácido jasmónico
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramo
KO	<i>Knock-out</i>
L	Litro
LRR	<i>Leucine-Rich Repeat</i> (Repetición rica en leucinas)
LS	<i>Lineage-Specific</i> (Específico de linaje)
m	Masa
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Proteína quinasa activada por mitógenos)
Mb	Megabase
MES	Ácido 2-(4-morfolino) etanosulfónico
mg	Miligramo
MHR	<i>Medium Homology Region</i> (Región de mediana homología)
MI	Medio de inducción
mL	Mililitro
MM	Medio mínimo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
ms	Milisegundo
N	Normal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBS	<i>Nucleotide Binding Site</i> (Sitio de unión a nucleótidos)
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NP	<i>Non-Pathogenic</i> (No patógeno)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de lectura abierta)
Pág.	Página

PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> (Patrón molecular asociado a patógenos)
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PGM	<i>Plant Growth Media</i> (Medio de crecimiento para plantas)
pH	Potencial de hidrógeno
PKA	<i>Protein kinase A</i> (Proteína quinasa A)
pM	Picomolar
PR	<i>Pathogenesis related proteins</i> (Proteínas relacionadas con la patogénesis)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de reconocimiento de patrones)
PTI	<i>PAMPs Triggered Immunity</i> (Inmunidad desencadenada por PAMPs)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RALF	<i>Rapid Alkalinization Factor</i> (Factor de alcalinización rápida)
REV / Rev	<i>Reverse</i>
RFO	<i>Resistance to Fusarium oxysporum</i> (Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i>)
RLK	<i>Receptors-Like Kinases</i> (Receptores semajantes a quinasas)
RNAseq	<i>RNA sequencing</i> (Secuenciación de ARN)
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
RQ	Relative Quantify of transcript (Cantidad relativa de transcrito)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (PCR con transcriptasa reversa)
RT-qPCR	<i>Real-time Quantitative PCR</i> (PCR cuantitativa a tiempo real)
s	Segundo
SA	Ácido salicílico
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> (Resistencia sistémica adquirida)
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> (Región amplificada de una secuencia caracterizada)
SDS	Dodecil-sulfato sódico

SSC	Tampón salino de citrato de sodio
T	Timina
TAE	Tris acético EDTA
TFB	<i>Transformation Buffer</i> (Tampón de transformación)
Tm	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades (actividad enzimática)
U	Uracilo
V	Voltio
V	Volumen
VCE	<i>Vascular Colonization Effectors</i> (Efectores de colonización vascular)
VCG	<i>Vegetative Compatibility Group</i> (Grupo de compatibilidad vegetativa)
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i> (Aglutinina de germen de trigo)
WT	<i>Wild-type</i> (Estirpe silvestre)
WV	<i>Weakly virulent</i> (Poco virulento)
x g	Aceleración gravitacional
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido
Δ	Delección / Diferencia
λ	Longitud de onda
Ω	Ohmio
μF	Microfaradio
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar

RESUMEN

SUMMARY

RESUMEN

Las interacciones entre las plantas y los organismos fitopatógenos están claramente influenciadas por una serie de factores entre los que se incluyen la disponibilidad de nutrientes, la presencia de otros organismos competidores en la rizosfera, el pH que rodea a la zona de interacción planta-patógeno, etc. El estudio de la influencia de estos y otros factores sobre las interacciones planta-patógeno posibilita el planteamiento de alternativas para evitar, o al menos minimizar, los daños ocasionados por los patógenos.

Los hongos fitopatógenos son responsables de un porcentaje elevado de los daños observados en las plantas y, por tanto, de gran parte de las pérdidas totales de producción agrícola (Cuming, 2009; Fisher *et al.*, 2012; Flood, 2010; Oerke, 2006). El quinto hongo fitopatógeno con mayor repercusión socio-económica y científica es *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. (Dean *et al.*, 2012), considerado un complejo de especies anamórficas que presentan variabilidad morfológica y fisiológica (O'Donnell *et al.*, 2009). Este hongo, presente en suelos de todo el mundo creciendo de forma saprofítica o colonizando diversas especies vegetales (O'Donnell *et al.*, 2009), es el agente causal de la fusariosis vascular o traqueomicosis. A pesar de que en conjunto el complejo de especies presenta un amplio rango de hospedador pudiendo infectar más de 100 hospedadores diferentes (Michielse y Rep, 2009; Nucci y Anaissie, 2007), los aislados de manera individual son capaces de colonizar una especie vegetal única o un grupo reducido de especies vegetales, lo que ha permitido clasificarlos en *formae speciales* (ff. spp.) en función de la especificidad de hospedador (Armstrong y Armstrong, 1975; Di *et al.*, 2016; Snyder y Hansen, 1940).

En nuestro grupo de investigación se aislaron y caracterizaron más de 140 aislados de la forma especial *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick y W.C. Snyder a partir de plantas de judía con síntomas de fusariosis (Alves-Santos *et al.*, 1999; Alves-Santos *et al.*, 2002a). Estos aislados se agruparon en grados de virulencia de acuerdo a la escala CIAT. El diagnóstico de la enfermedad se vio facilitado por el diseño de un SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) con el que se identifican de forma específica estirpes muy virulentas de *F. oxysporum* (Alves-Santos *et al.*, 2002b). El análisis de la secuencia del SCAR permitió identificar una ORF

que fue denominada *FTF1* (*Fusarium Transcription Factor 1*) y posteriormente, un segundo gen que se denominó *FTF2* (Ramos *et al.*, 2007). Los dos genes codifican para factores de transcripción específicos de hongos y comparten una elevada homología, lo que permitió agruparlos en la familia génica *FTF* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Mientras *FTF2* es un gen de copia única bien conservado en todos los ascomicetos filamentosos (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), *FTF1* es un gen multicopia exclusivo de aislados muy virulentos del complejo de especies *F. oxysporum* (Ramos *et al.*, 2007). Los estudios llevados a cabo con esta familia génica han permitido conocer el papel de *FTF1* y *FTF2* como factores de virulencia en *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Se ha demostrado que *FTF1* modula la virulencia actuando como regulador de la expresión de los genes *SIX*, codificadores para moléculas efectoras (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016); sin embargo, en el caso de *FTF2* apenas se tiene información acerca de las dianas que son reguladas por él.

En el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral nos propusimos analizar la capacidad de colonización de plantas de judía común por parte de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, en primer lugar analizando la influencia que tiene la concentración de la fuente de carbono sobre la capacidad del hongo para modular el pH ambiental, modulación que ya se ha demostrado clave en la patogenicidad en otros sistemas (Prusky y Yakoby, 2003; Prusky *et al.*, 2001; Prusky *et al.*, 2016). Y por otro lado, estudiando el papel del factor de transcripción *FTF2* en la colonización del hospedador.

El **Capítulo I** describe la influencia de la disponibilidad de la fuente de carbono presente en el medio sobre la capacidad del hongo para modular el pH ambiental. Los hongos son capaces de modular el pH a través de la secreción de pequeñas moléculas orgánicas (Alkan *et al.*, 2008; Bateman y Beer, 1965; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2008; Eshel *et al.*, 2002b; Manteau *et al.*, 2003; Miyara *et al.*, 2010; Miyara *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012; Prusky *et al.*, 2004; Ruijter *et al.*, 1999) para alcanzar valores de pH óptimos para la infección sobre el hospedador (Alkan *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2009; Barad *et al.*, 2014; Miyara *et al.*, 2010; Prusky y Yakoby, 2003). Por otro lado se ha sugerido un papel importante durante el proceso de infección para la fuente de carbono disponible en el medio, tanto en patógenos de post-cosecha (Prusky *et al.*,

2016) como en patógenos radiculares (Compant *et al.*, 2010; Lugtenberg *et al.*, 1999). Analizamos el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la capacidad del hongo para modular el pH evaluando los cambios del pH del medio extracelular y la acumulación de dos moléculas orgánicas (amonio y ácido glucónico) durante el cultivo *in vitro* de *F. oxysporum* en medio suplementado con una elevada (175 mM) o una baja (15 mM) concentración de sacarosa. Nuestros resultados demuestran la capacidad de alcalinización de *F. oxysporum* cuando es cultivado en concentraciones bajas de fuente de carbono (sacarosa 15 mM). Este efecto es causado por la acumulación en el medio del amonio secretado por el hongo. Sin embargo, cuando la fuente de carbono está presente en exceso (sacarosa 175 mM), se secretan pequeñas cantidades de ácido glucónico que no tienen ningún efecto en el pH del medio extracelular. Por tanto en este trabajo se han confirmado resultados previos de otros grupos de investigación que situaron a *F. oxysporum* dentro de los hongos alcalinizadores (Miyara *et al.*, 2012; Prusky y Yakoby, 2003).

Los trabajos realizados para dilucidar la regulación génica que subyace a la capacidad de modulación del pH por los hongos, han permitido identificar al factor de transcripción PacC como el máximo responsable de esa regulación a través de la regulación positiva que ejerce sobre genes alcalinos y la regulación negativa sobre genes ácidos (Alkan *et al.*, 2013; Di Pietro *et al.*, 2003; Ment *et al.*, 2015; Peñalva y Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995). Este factor de transcripción se activa a través de varios procesos proteolíticos siempre en presencia de condiciones alcalinas en el medio de crecimiento (Arst Jr y Peñalva, 2003; Caracuel *et al.*, 2003; Li y Mitchell, 1997; Orejas *et al.*, 1995; Peñalva y Arst, 2002; Prusky y Yakoby, 2003; Tilburn *et al.*, 1995). Una concentración reducida en la fuente de carbono es suficiente para inducir condiciones alcalinas, por lo que serían condiciones óptimas para la activación de PacC. Para confirmar esta hipótesis en la que la activación de PacC es dependiente de la concentración de la fuente de carbono, evaluamos la expresión del gen homónimo y de un conjunto de genes ácidos y alcalinos, presumiblemente regulados por PacC, en muestras de micelio incubadas en los dos medios indicados anteriormente. Los resultados demostraron que la expresión de *PacC* sólo se induce en condiciones de baja concentración en la fuente de carbono (sacarosa 15 mM). Por otro lado, el análisis de expresión de los genes presumiblemente regulados por PacC no mostró resultados

claros para los genes ácidos, al no observarse una clara reducción en su expresión en condiciones alcalinas; para los genes alcalinos, sin embargo, se observó una inducción de expresión en las mismas condiciones, de forma paralela a la inducción de expresión observada previamente para *PacC*.

Los resultados en conjunto sugieren un modelo de interacción de varios elementos, en el que la baja concentración de fuente de carbono induce condiciones alcalinas de crecimiento mediante la secreción y acumulación de amonio, que permiten la inducción de *PacC*, encargado de regular, positiva o negativamente, la expresión de un conjunto de genes implicados en la modulación de la virulencia fúngica.

El **Capítulo II** está dedicado a la caracterización de *FTF2* en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

FTF2 y su homólogo *FTF1* han sido descritos como factores de transcripción del grupo de proteínas *zinc cluster proteins* (MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling y Holmberg, 1996) por contener un dominio de unión al ADN tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). Aguas abajo del extremo carboxilo de ese dominio, ambas proteínas contienen otro dominio funcional, el dominio MHR o región de mediana homología (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007), encargado de la regulación de la especificidad de unión del dominio de unión al ADN (MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling y Holmberg, 1996). El modelado tridimensional del dominio MHR para *FTF1* y *FTF2* realizado, ha revelado la existencia de una estructura en forma de α -hélice en *FTF2* y no en *FTF1*, que podría ser responsable de la especificidad de unión de *FTF2* a ciertos *loci* a los que no se une *FTF1*. En este sentido esta estructura podría determinar las diferentes funciones asociadas a cada factor de transcripción.

Se ha propuesto que, debido a que el origen más plausible para los parálogos de *FTF1* está en la duplicación y divergencia de *FTF2* (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007), los factores de transcripción *FTF2* y *FTF1* podrían compartir algunas funciones, mientras que *FTF1* habría perdido algunas o incluso adquirido funciones nuevas como consecuencia de la divergencia (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Las funciones asociadas exclusivamente a *FTF2*

fueron identificadas mediante la consecución y caracterización de mutantes nulos en el gen ($\Delta FTF2$). Estos mutantes mostraron reducción en la tasa de esporulación en tiempos cortos de incubación en medio líquido respecto a la estirpe silvestre; durante su cultivo en medio sólido se observó una elevada producción de esporas de tipo macroconidio, esporas que, de forma casi exclusiva, se observan al final del proceso de infección sobre los tejidos del hospedador cuando éste ya está muerto (Leslie y Summerell, 2006). Estos resultados sugieren que FTF2 está implicado en algún paso, aún no identificado, de la regulación del proceso de esporulación del hongo. Por otro lado, el proceso de germinación estuvo adelantado en los mutantes $\Delta FTF2$, al igual que ocurre con mutantes nulos en el gen *EBR1* en *Fusarium graminearum*. *EBR1* ha sido relacionado con la ruta de proteínas de tipo GTPasa encargada de regular la germinación en el hongo (Zhao *et al.*, 2011). Según nuestros análisis transcriptómicos, la expresión del gen codificador para una proteína de tipo Ras-GTPasa (FOXG_09392), que se localiza próximo al extremo 3' de *FTF2*, se encuentra drásticamente reducida en mutantes $\Delta FTF2$ respecto a la estirpe silvestre. Por tanto, FTF2 podría tener un papel en la germinación del hongo regulando la expresión de genes codificadores de proteínas de tipo GTPasa.

A tenor del fenotipo observado para mutantes silenciados en la familia *FTF* al completo y para mutantes con expresión constitutiva de una copia funcional de *FTF1* que no muestran alteración alguna ni en germinación ni en esporulación (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), parece que ambos factores no comparten funciones en ninguno de estos dos procesos. Los ensayos de inoculación sobre plantas de judía común llevados a cabo con mutantes $\Delta FTF2$ en este trabajo han demostrado que FTF2 es necesario para la completa virulencia de *F. oxysporum*, al igual que se demostró previamente para FTF1 (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). El estudio mediante microscopía láser confocal del patrón de colonización de la planta por la estirpe mutante y la estirpe silvestre, demostró que la reducción en los síntomas de fusariosis en las plantas inoculadas con las estirpes $\Delta FTF2$ se debió al retraso de éstas para penetrar y colonizar el sistema radicular. Además, los mutantes $\Delta FTF2$ inducen la sobreexpresión de *PR1*, gen marcador de la respuesta defensiva del huésped mediada por ácido salicílico, lo que sugiere que FTF2 está implicado en la supresión de esta respuesta.

Los análisis transcriptómicos realizados sobre muestras de ARN obtenidas de cultivos *in vitro* de las estirpes mutante $\Delta FTF2$ y silvestre, identificaron dos *loci* codificadores para hidrofobinas de tipo II cuya expresión está drásticamente reducida en las estirpes $\Delta FTF2$. Las hidrofobinas son proteínas implicadas en el enmascaramiento de las hifas y las esporas (Bayry *et al.*, 2012) y son necesarias para la patogenicidad en *Magnaporthe grisea* (Kim *et al.*, 2005). La expresión de uno de estos genes (FOXG_02746) se mostró inducida de manera específica durante la colonización del sistema radicular por la estirpe silvestre FOP-SP1. La inducción del *locus* FOXG_02746, codificador para una hidrofobina, específicamente durante la colonización del sistema radicular y el retraso en la colonización observado en los mutantes nulos en *FTF2*, sugieren un modelo para el reconocimiento del patógeno por el hospedador. En este modelo *FTF2* activa a FOXG_02746 y la hidrofobina codificada por este gen contribuye al enmascaramiento del hongo evitando el reconocimiento por el hospedador.

Recientemente se ha sugerido que *FTF2* también contribuye en la regulación de la expresión de los genes *SIX* en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (van der Does *et al.*, 2016). Analizamos la expresión de los genes *SIX1* y *SIX6* en plantas de judía común inoculadas con las estirpes FOP-SP1 $\Delta FTF2$. Los resultados obtenidos han demostrado que *FTF2* activa ambos genes, de igual forma que ya había sido demostrado previamente para *FTF1* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

SUMMARY

Plant-pathogen interactions depend on different factors like availability of nutrients, competition with other organisms in the rizosphere, pH in the contact area between host and pathogen, etc. The research about the influence of these and other factors let us to suggest alternatives to avoid or at least reduce the damage caused by pathogens.

Phytopathogenic fungi are responsible for a high percentage of the observed damage in plants, and therefore for many of the losses in crops productivity (Cuming, 2009; Fisher *et al.*, 2012; Flood, 2010; Oerke, 2006). *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr., considered the fifth phytopathogenic fungus in importance based on scientific/economic influence (Dean *et al.*, 2012), is an anamorphic species complex with considerable morphological and physiological variation (O'Donnell *et al.*, 2009). This fungus is ubiquitous in soils worldwide being able to grow saprophytically or colonizing plants (O'Donnell *et al.*, 2009) and is the causal agent of Fusarium wilt. Despite the broad host range at the species complex level with more than 100 possible hosts (Michielse and Rep, 2009; Nucci and Anaissie, 2007), the individual isolates are able to infect only one or a few plant species. This allows for a classification into *formae speciales* (ff. spp.) based on host-specificity (Armstrong and Armstrong, 1975; Di *et al.*, 2016; Snyder and Hansen, 1940).

In former works in our group we isolated and characterized more than 140 isolates of *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick y W.C. Snyder from infected common bean plants (Alves-Santos *et al.*, 1999; Alves-Santos *et al.*, 2002a). The isolates were classified into virulence groups according to the CIAT scale index. The diagnosis of Fusarium wilt was easier due to the design of a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) exclusive of highly virulent strains of *F. oxysporum* (Alves-Santos *et al.*, 2002b). The analysis of the SCAR sequence led to the identification of an ORF named *FTF1* (*Fusarium Transcription Factor 1*) and thereafter a second gene named *FTF2* (Ramos *et al.*, 2007). Both of them are fungal specific transcription factors and share a high level of similarity, thus composing the *FTF* gene family (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). While *FTF2* is a single copy well conserved gene present in all Ascomycete fungi (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), *FTF1* is a multicopy gene exclusive of highly virulent

strains of *F. oxysporum* species complex (Ramos *et al.*, 2007). Both, FTF1 and FTF2, have been described as virulence factors in *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). It has been shown that FTF1 modulates virulence regulating the expression of SIX effectors coding genes (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016), but less is known about the targets of FTF2 regulation.

The aim of the study presented in this Thesis was to gain insight on host plant colonization by *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, first analyzing the influence of sugar on the fungal ability to modulate environmental pH, important for fungal pathogenicity as it has been demonstrated in other systems (Prusky and Yakoby, 2003; Prusky *et al.*, 2001; Prusky *et al.*, 2016). And second, studying the role of the transcription factor FTF2 in host colonization.

Chapter I describes how the environmental carbon source availability affects the fungal ability to modulate environmental pH. Fungi are able to modulate surrounding pH through secretion of small organic molecules (Alkan *et al.*, 2008; Bateman and Beer, 1965; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2008; Eshel *et al.*, 2002b; Manteau *et al.*, 2003; Miyara *et al.*, 2010; Miyara *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012; Prusky *et al.*, 2004; Ruijter *et al.*, 1999) to reach optimal values of pH for host infection (Alkan *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2008; Barad *et al.*, 2014; Miyara *et al.*, 2010; Prusky and Yakoby, 2003). On the other hand it has been suggested an important role for carbon source availability during plant colonization both by post-harvest pathogens (Prusky *et al.*, 2016) and root pathogens (Compant *et al.*, 2010; Lugtenberg *et al.*, 1999). We analyzed the carbon source effect on the fungal ability to modulate pH by means of the evaluation of pH changes of external media and the accumulation of two small organic molecules (ammonium and gluconic acid) during *in vitro* growth of *F. oxysporum* either in media with 175 mM sucrose or with 15 mM sucrose. Our results show that *F. oxysporum* alkalinizes the surrounding media under conditions of carbon deprivation (15 mM sucrose). This effect is produced by the accumulation of the ammonium secreted by the fungus. However, when sugar is present in excess (175 mM sucrose) only small amounts of gluconic acid with no effect on pH are secreted. These results

support previous results obtained in other groups that allowed for a classification for *F. oxysporum* as alkalinizing fungus (Miyara *et al.*, 2012; Prusky and Yakoby, 2003).

It has been demonstrated that modulation of pH by fungi is regulated by transcription factor PacC through the upregulation of alkaline genes and downregulation of acid genes (Alkan *et al.*, 2013; Di Pietro *et al.*, 2003; Ment *et al.*, 2015; Peñalva and Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995). PacC requires alkaline conditions to be active by means of several proteolytic events (Arst Jr and Peñalva, 2003; Caracuel *et al.*, 2003; Li and Mitchell, 1997; Orejas *et al.*, 1995; Peñalva and Arst, 2002; Prusky and Yakoby, 2003; Tilburn *et al.*, 1995). Limited carbon is enough to induce alkaline conditions, which should be optimal conditions for PacC activation. To confirm this hypothesis in which PacC activation depends on carbon source availability, we analyzed the expression of *PacC* and several both acid and alkaline *PacC* responsive-genes using mycelium grown in both media previously described. The results showed that *PacC* expression is produced only under conditions of carbon deprivation (15 mM sucrose). On the other hand, expression analysis of *PacC* responsive-genes did not show clear results for acid genes, which were not clearly downregulated in alkaline conditions; however, alkaline genes were induced in the same conditions in parallel with *PacC* induction previously observed.

Together, these results suggest an interaction model between several components in which limited carbon induces alkaline conditions, through the secretion and accumulation of ammonium, which in turn activates *PacC* and leads to upregulation or downregulation of several genes involved in the modulation of fungal virulence.

Chapter II is dedicated to the characterization of *FTF2* in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

FTF2 and its homologue *FTF1* have been described as transcription factors that belong to zinc cluster proteins (MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling and Holmberg, 1996) as they contain a $Zn(II)_2Cys_6$ binuclear cluster DNA-binding motif (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). Downstream of the DNA-binding motif both proteins contain another functional motif named MHR or medium homology region (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007) that regulates the binding specificity of the

first motif (MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling and Holmberg, 1996). Tridimensional modelling of MHR both for FTF1 and FTF2 proteins carried out in this work identified an α -helix exclusive of FTF2 that could be responsible for the binding specificity of FTF2 to certain *loci* that FTF1 does not recognize. In this sense this structure would determine the different roles associated to each transcription factor.

It has been suggested that the *FTF* gene family has evolved by gene duplication of an ancestral gene (*FTF2*) and the subsequent accumulation of mutations in the duplicated copies (*FTF1* paralogues) (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016). If this is true, FTF2 and FTF1 should share some functions and FTF1 could have lost some of them or even acquired new ones as a result of the divergence (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016). In this Chapter we obtained and characterized *FTF2* null mutants (Δ *FTF2*) to identify roles associated exclusively to FTF2. Δ *FTF2* strains showed reduction of the sporulation rate when grown in liquid media for short time points; when they were grown on solid media they produced high amounts of macroconidia, a class of spores that have been almost just observed on dead plant tissues at the end of host infection (Leslie and Summerell, 2006). These observations suggest that FTF2 is somehow involved in the regulation of the sporulation process. On the other hand, conidia germination was quicker for Δ *FTF2* strains, in a similar way as described for the *EBR1* null mutants in *Fusarium graminearum*. The *EBR1* gene has been related to the GTPase pathway involved in the regulation of the germination process (Zhao *et al.*, 2011). According to our transcriptomic analysis, expression of a Ras-GTPase coding gene (FOXG_09392), located close to 3' end of FTF2, is dramatically reduced in Δ *FTF2* strains in comparison to wild-type one. Therefore, FTF2 might be involved in fungal germination by regulating the expression of genes encoding GTPase proteins.

Mutants attenuated in the expression of the *FTF* gene family and mutants that overexpress a functional paralogue of *FTF1* do not show alterations neither in conidia germination nor in sporulation rate, suggesting that FTF1 and FTF2 do not share the same roles in these two processes. Inoculation assays carried out on common bean plants with Δ *FTF2* strains demonstrated that FTF2 is required for full virulence in *F. oxysporum*, as it was previously described for FTF1 (Niño-Sánchez, *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). The study by confocal laser microscopy of the host colonization pattern of

both mutant and wild-type strains showed that the reduction of Fusarium wilt symptoms in plant inoculated with $\Delta FTF2$ strains was due to the delay of these strains to penetrate and colonize the root system. Also, $\Delta FTF2$ mutants induce overexpression of *PR1*, the marker gene of the plant defense response mediated by salicylic acid, suggesting that FTF2 is involved in the suppression of this response.

The transcriptomic analysis of in culture RNA expression in $\Delta FTF2$ strains and the wild-type strains identified two hydrophobins type II coding genes that are dramatically downregulated in $\Delta FTF2$ strains. Hydrophobins are proteins involved in hyphae/spores masking (Bayry *et al.*, 2012) and are required for pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (Kim *et al.*, 2005). One of these genes (FOXG_02746) was specifically upregulated during root system colonization by the wild-type strain FOP-SP1. The induction of the hydrophobin II encoding locus FOXG_02746 specifically during the colonization of the root system and the delay in the colonization observed in *FTF2* null mutants, suggest a model of fungal recognition by the host. In this model FTF2 activates FOXG_02746 and the encoded hydrophobin contributes to mask the fungus to avoid the recognition by the host.

Finally, as it was shown that FTF2 also contributes to the regulation of SIX encoding genes in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (van der Does *et al.*, 2016), we tested the expression of genes *SIX1* and *SIX6* in common bean plants inoculated with $\Delta FTF2$ strains. The results obtained show the activation by FTF2 of both genes as it was previously shown for FTF1 (Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

INTRODUCCIÓN

1.- Los hongos fitopatógenos

Las plantas se encuentran en la naturaleza rodeadas permanentemente por una gran variedad de microorganismos, algunos capaces de inducir en ellas enfermedades de diverso tipo. En ese gran grupo de microorganismos destacan los hongos fitopatógenos por causar importantes pérdidas económicas a nivel mundial (Agrios, 2005), habiéndose estimado que, del total de pérdidas de producción agrícola, aproximadamente el 40% es debido fundamentalmente a enfermedades de origen fúngico (Cuming, 2009; Fisher *et al.*, 2012; Flood, 2010; Oerke, 2006). Los hongos fitopatógenos no sólo causan enormes daños sobre multitud de cultivos y materiales vegetales almacenados, algunos además son capaces de producir toxinas que suponen un problema para la salud tanto del ganado como de los humanos consumidores de los vegetales contaminados.

De las más de 100.000 especies de hongos descritas hasta el momento, más de 10.000 pueden causar enfermedades en las plantas. El estilo de vida de estos hongos fitopatógenos es muy diverso lo que les ha permitido desarrollar estrategias diferentes para interactuar con sus huéspedes (Agrios, 2005). De esta forma se han establecido tres grupos de hongos fitopatógenos en función de la estrategia que utilizan para interactuar con su huésped:

- Saprófitos oportunistas o facultativos: tienen capacidad para vivir de forma saprofítica hasta que encuentran un huésped apropiado.
- Parásitos oportunistas o facultativos: se aprovechan de los recursos nutricionales de la planta cuando ésta se encuentra debilitada por causas variables (bióticas o abióticas).
- Parásitos obligados: adoptan una forma de resistencia para sobrevivir cuando no tienen un huésped sobre el que desarrollarse.

Por otro lado, los hongos fitopatógenos se han clasificado tradicionalmente en función de su estilo de vida, estableciéndose tres grupos:

- Patógenos biotrofos: se incluyen en este grupo los hongos fitopatógenos que han desarrollado estructuras especializadas para colonizar células vivas de su huésped de las que obtienen los nutrientes que necesitan para vivir. Necesitan

que las células del huésped se mantengan vivas para completar total o parcialmente su ciclo de vida, por lo que causan daños relativamente pequeños en la pared celular vegetal lo que permite al huésped mantenerse con vida (Lewis, 1973). De esta forma el hongo depende totalmente del huésped (Mendgen y Hahn, 2002). Se incluyen en este grupo especies como *Puccinia graminis*, *Passalora fulva* o *Ustilago maydis* entre otras (Horbach *et al.*, 2011).

- Patógenos necrotrofos: carecen de estructuras especializadas para la infección, matan a las células y tejidos de su hospedador secretando toxinas y enzimas degradadoras de pared celular. Posteriormente se alimentan de forma saprofítica de esta materia orgánica muerta (Lewis, 1973). *Alternaria* spp., *Botrytis* spp. o *Verticillium* spp. son algunos ejemplos de hongos necrotrofos (Horbach *et al.*, 2011; Mendgen y Hahn, 2002).
- Patógenos hemibiotrofos: los hongos pertenecientes a este grupo presentan una primera fase de vida biotrófica durante la cual el hongo penetra dentro del huésped y se establece en el tejido colonizado, seguidamente pasan a una fase de vida necrotrófica en la que utilizan los nutrientes de las células del huésped ya muertas (Bailey *et al.*, 1992; Luttrell, 1974; Mendgen y Hahn, 2002; Parbery, 1996; Perfect *et al.*, 1999). Se incluyen en este grupo hongos como *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea* o *Colletotrichum* spp. (Horbach *et al.*, 2011).

Independientemente de su estilo de vida, los hongos fitopatógenos pueden diferenciarse en función de su especificidad de hospedador. Así son monófagos aquellos hongos patógenos de un hospedador específico (*Alternaria alternata*, *F. oxysporum*), y polífagos los patógenos que presentan una baja especificidad de hospedador siendo capaces de infectar un amplio número de especies vegetales (*B. cinerea*, *Rhizoctonia* spp.).

Esta variabilidad en el estilo de vida y estrategias de infección, así como las diferencias morfológicas entre especies, dificultan el control de estos patógenos. Los agricultores utilizan tratamientos basados en fungicidas químicos de distinto tipo para combatir las infecciones debidas a hongos, lo que tiene consecuencias negativas para el medio ambiente. A esto se suma el hecho de que las prácticas agrícolas actuales se basan en la siembra de semillas de un mismo genotipo en grandes extensiones de

terreno, lo que reduce la diversidad genética en los cultivos y facilita la selección de aislados fúngicos capaces de adquirir rápidamente resistencia a los distintos agroquímicos utilizados. Todos estos aspectos hacen que sea necesario un proceso continuo de desarrollo e introducción de nuevas semillas con caracteres resistentes mediante mejora genética para combatir a estos patógenos (Strable y Scanlon, 2009). Por tanto, se hace clave entender las estrategias de infección de los hongos, los detalles de la respuesta defensiva de la planta y el mecanismo de la interacción planta-hongo para encontrar sistemas de resistencia y control eficaces, intentando así solventar los problemas biológicos y económicos que causan los hongos fitopatógenos.

2.- El género *Fusarium*

Dentro de los hongos fitopatógenos uno de los géneros más importantes es el género *Fusarium*, que comprende un grupo extenso y heterogéneo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en suelos tanto naturales como cultivados. Viven de forma saprofítica en el suelo, obteniendo los nutrientes necesarios para su supervivencia a partir de materia orgánica muerta o detritos desechados por otros seres vivos. Muchos de ellos tienen la capacidad de colonizar gran variedad de hospedadores vegetales mediante diferentes estrategias de infección, provocando en ellos la enfermedad conocida como fusariosis, y precisamente por esta capacidad son considerados hongos fitopatógenos (Desjardins, 2003; Di Pietro *et al.*, 2003; Goswami y Kistler, 2004).

El cuadro sintomatológico de fusariosis presentado por la planta es diverso y general (marchitamiento, podredumbre de raíz, producción de chancros, etc.) debido a la complejidad del género *Fusarium* y al alto rango de especies vegetales susceptibles de ser infectadas por algún miembro de este género. El nombre que se asigna a la enfermedad en algunos casos es específico en función de los efectos ocasionados en la planta, como ocurre con la roya del trigo, el tizón de la cebada, la podredumbre del maíz o el mal de Panamá que afecta a bananos. Al ser patógenos de un grupo de plantas tan amplio, el control de los hongos de este género en cultivos de interés agrícola permitiría reducir las enormes pérdidas económicas que ocasionan (Ma *et al.*, 2010).

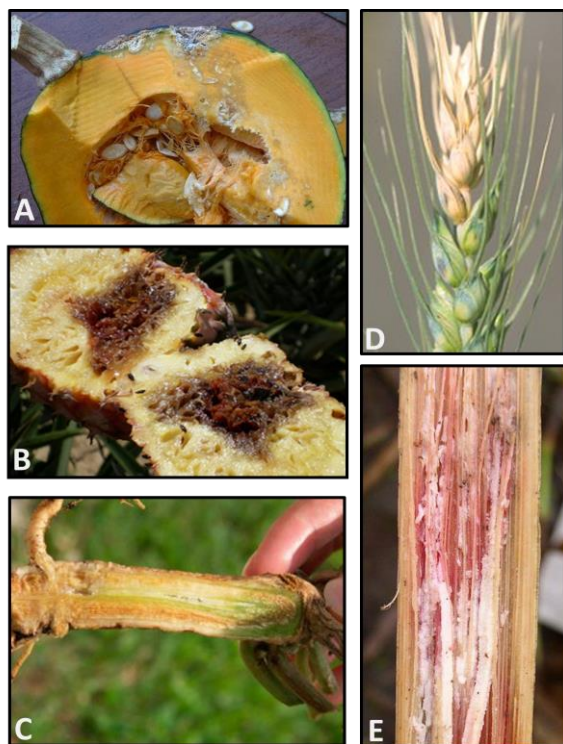


Figura 1. Síntomas de fusariosis en diferentes hospedadores vegetales. A-B, Fusariosis por *Fusarium* spp. en calabaza (A) y piña (B). **C,** Fusariosis por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en pepino. **D-E,** Fusariosis por *Fusarium graminearum* en trigo (D) y maíz (E).

Algunos miembros del género son utilizados como agentes de control biológico de plagas, y otros como productores de metabolitos secundarios de interés comercial como la ciclosporina o las giberelinas (Desjardins *et al.*, 1993; Desjardins, 2003). En contraposición a estos usos beneficiosos, hay algunas especies conocidas por ser productoras de micotoxinas y metabolitos secundarios que suponen un riesgo indirecto en animales y humanos quienes pueden padecer enfermedades de diversa consideración causadas por la ingesta de productos vegetales contaminados con las moléculas mencionadas (Desjardins, 2003). Las últimas líneas de investigación en este campo tienen objetivos clínicos al haberse descrito el género *Fusarium* como un patógeno humano en pacientes inmunodeprimidos (Nelson *et al.*, 1994; Ortoneda *et al.*, 2004) siendo el agente causal de enfermedades como queratitis fúngica, artritis o endoftalmitis (Dóczi *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2004).

Taxonomía

El género *Fusarium* fue definido por primera vez en la terminología moderna del sistema científico por Link en 1809, aunque los primeros datos recogidos sobre este género son los de un monje franciscano en México en el siglo XVI que estaban

basados en las descripciones del pueblo Azteca sobre la podredumbre del maíz causada por el hongo conocido ahora como *Fusarium verticillioides*.

El género presenta una clasificación compleja. Su taxonomía ha sufrido cambios a lo largo del último siglo, y actualmente se encuentra incluido dentro del grupo de hongos Ascomycetos, en la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia *Nectriaceae*, estando subdividido en 16 secciones (Nelson *et al.*, 1994) que agrupan aproximadamente a 150 especies filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos (Seifert y Levesque, 2004). Más que especies, se considera que las secciones agrupan complejos de especies, cada uno de los cuales incluye especies relacionadas entre sí.

La correcta clasificación dentro del género *Fusarium* ha sido problemática desde su inicio debido en parte a los diferentes y contrapuestos sistemas de clasificación morfológicos utilizados (Link en 1809; Fries en 1841; Wollenweber y Reiking en 1935; Snyder y Hansen en 1957 (Snyder *et al.*, 1957); Gerlach y Nirenberg en 1982), y también debido a las diferentes clasificaciones de Nelson de 1983 (Nelson *et al.*, 1983) y de 1990, quien terminó diferenciando 14 especies dentro del género. A pesar de sus diferencias, todas estas clasificaciones se basan fundamentalmente en las diferencias encontradas durante la evaluación de distintos caracteres morfológicos: forma, tamaño, septación de los conidios y clamidosporas; tipo y coloración del micelio de las colonias en medios sólidos sintéticos; todos criterios con una elevada variabilidad en función de las condiciones del medio de crecimiento o del tipo de incubación del cultivo (Leslie *et al.*, 2001; Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2003).

Los problemas que ha planteado y aún plantea una clasificación filogenética puramente morfológica basada en diferencias y no en similitudes compartidas entre aislados, han puesto en auge en los últimos quince años las herramientas moleculares como método para la identificación y determinación de las relaciones evolutivas en el género, más fiables y menos dependientes de condiciones externas. Estas herramientas moleculares incluyen la secuenciación de regiones intergénicas del ADN ribosómico nuclear (ADNr): ITS o espaciadores intergénicos transcritos ITS1 (entre 18S y 5,8S) e ITS2 (entre 5,8S y 28S); e IGS o regiones espaciadoras intergénicas (entre 28S y 18S), cuya variabilidad entre especies del mismo género es mayor que la de las

regiones ITS pudiéndose utilizar en ocasiones en una clasificación intraespecífica (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Appel y Gordon, 1995; Mirete *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2002; Voigt *et al.*, 1995). En la elaboración de la filogenia también se han utilizado otras secuencias de genes de copia única ricas en intrones como son los genes codificantes de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3, poligalacturonasas (*pg1*) o los dos genes idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2* (Kawabe *et al.*, 2005; Seifert y Levesque, 2004). A pesar de la multitud de posibilidades, la secuencia más utilizada en la discriminación de especies dentro del género *Fusarium* es la secuencia del gen *EF-1 α* , codificante para un factor de elongación de la traducción a proteínas (Geiser *et al.*, 2004). Las ventajas de utilizar este gen son: es de copia única, no se han encontrado copias ortólogas, posee una secuencia rica en regiones intrónicas y presenta un alto nivel de polimorfismo entre especies muy próximas. Recientemente también se ha utilizado la técnica de los microarrays de ADN para estimar la variabilidad genética y realizar estudios filogenéticos a nivel de género (Lievens *et al.*, 2003).

Morfología

Los hongos del género *Fusarium* son organismos haploides que forman colonias muy variables en forma y coloración. Así encontramos especies que forman colonias en las que hay una abundante producción de micelio aéreo algodonoso, mientras que en otros casos las colonias apenas tienen micelio de este tipo. La pigmentación de las colonias y los cultivos de las distintas especies de *Fusarium* varía desde coloraciones claras como el blanco o el amarillo hasta coloraciones más oscuras como el violeta o el marrón. Las condiciones de cultivo y el tipo de medio de cultivo utilizado son claves en la adopción de una u otra pigmentación. Los pigmentos producidos por el hongo en algunos casos son fotosensibles, en otros casos son sensibles al pH del medio al que son excretados por el propio hongo (Leslie y Summerell, 2006).

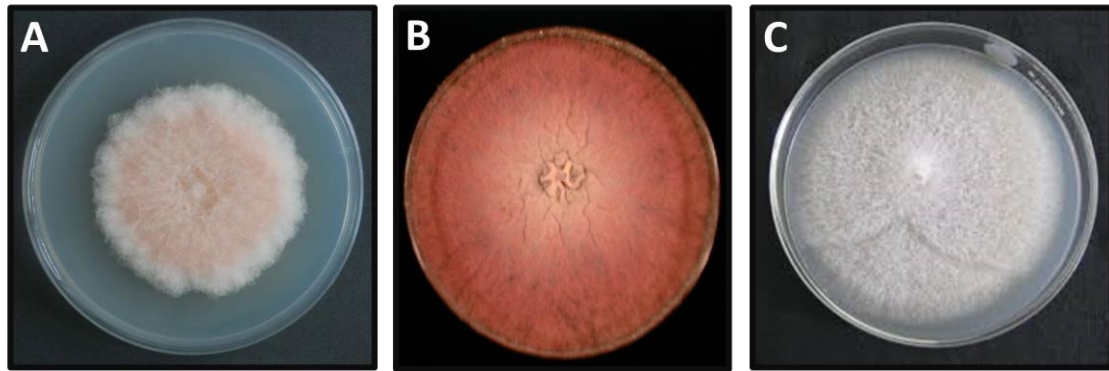


Figura 2. Colonias de especies del género *Fusarium*: variabilidad en tipo y coloración de colonia. A, *Fusarium equiseti* en medio PDA; B, *Fusarium graminearum* en medio MEA; C, *Fusarium oxysporum* en medio PDA.

Las especies del género forman esporas pluricelulares en forma de macroconidios. Éstos son muy característicos: son fusiformes, hialinos, alargados, curvados y septados, y se forman, en la mayoría de las especies, en una estructura especializada denominada esporodoquio. La forma más o menos curvada, el grosor de la zona central de la espora, y la forma y tamaño de las células apicales y basales de los macroconidios se consideran caracteres distintivos de cada especie (Leslie y Summerell, 2006).

Algunas especies del género tienen la capacidad de producir esporas en forma de microconidios, de un tamaño menor que el que presentan los macroconidios, con una o dos células; y aunque generalmente no son septados, en algunos casos pueden presentar de 1 a 2 septos. La forma de los microconidios es variable (arriñonada, ovalada, ovoidal, etc.), pudiendo encontrarse diferentes formas dentro de un mismo cultivo. Los microconidios se producen en conidióforos cuyas células pueden ser bien monofiálicas con una única salida para esporas en cada célula o bien polifiálicas con varias salidas para esporas en cada célula (Leslie y Summerell, 2006), en ambos casos con una longitud que puede ser mayor o menor dependiendo de la especie.

En algunas especies se ha observado también la producción de formas de resistencia denominadas clamidosporas. Presentan una o dos células, tienen forma esférica y su pared está engrosada. Su formación requiere de un tiempo prolongado (más de seis semanas desde el inicio del cultivo) y no suelen producirse en un número elevado (Leslie y Summerell, 2006).

Reproducción

Una característica de importancia destacada en el género *Fusarium* es la variabilidad en cuanto a su capacidad de reproducción sexual, conociéndose especies teleomórficas o de reproducción sexual conocida, y especies anamórficas, agámicas o de reproducción sexual desconocida.

Las formas teleomórficas de *Fusarium* se incluyen en los géneros *Gibberella* y algunos géneros segregados de *Nectria*. Algunos ejemplos de miembros de *Fusarium* con reproducción sexual conocida son *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) y *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi*). En estas especies se da una fusión de los núcleos de diferentes individuos originándose un núcleo diploide que, posteriormente, sufre meiosis generando de esta manera variabilidad genética. Los fenómenos de reproducción sexual están controlados por mecanismos cuyos genes responsables se denominan genes de apareamiento o *mating-type*; genes que consisten en un *locus* con dos alelos funcionales, de baja similitud de secuencia (idiotipos), a los que se ha designado tradicionalmente como *MAT-1* y *MAT-2* (Glass *et al.*, 1990; Hornok *et al.*, 2007; Kerényi *et al.*, 2004; Keszthelyi *et al.*, 2006), y que son los que determinan la habilidad de dos individuos para fusionar sus núcleos (Nelson, 1996). A diferencia de lo que ocurre en levaduras, en las formas teleomórficas de *Fusarium* no existen copias adicionales de los alelos de estos genes en otros *loci* (Coppin *et al.*, 1997); sin embargo se ha descrito que estos genes de apareamiento están presentes, se expresan y se procesan correctamente también en formas anamórficas como *Fusarium oxysporum*, lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales que regulan la reproducción sexual (Kerényi *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2000). En este sentido, un estudio reciente indica que la proteína Ste2, homóloga de un α -receptor de feromonas sexuales de *Saccharomyces cerevisiae*, se requiere en *F. oxysporum* para el quimiotropismo hacia la planta huésped (Turrà *et al.*, 2015).

La generación de variabilidad genética en las formas anamórficas se debe a distintos mecanismos: existencia de heterocariosis o fusión de hifas sin cariogamia (Burnett, 1984; Correll *et al.*, 1987; Puhalla, 1985; Teunissen *et al.*, 2002), una intensa actividad de elementos transponibles o transposones (Daboussi y Capy, 2003), y una

mayor probabilidad de sufrir duplicaciones, deleciones y transposiciones génicas (Kistler *et al.*, 1995).

La diploidía conseguida con la heterocariosis aporta ciertos beneficios a los hongos haploides. Dos estirpes capaces de formar un heterocarionte vegetativo, es decir, que mantienen de manera indefinida dos núcleos diferentes en la misma hifa, pertenecen a un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG, *Vegetative Compatibility Group*); si por el contrario, tras la fusión de las hifas, se produce una lisis celular, las estirpes se consideran incompatibles (Glass *et al.*, 2000; Leslie, 1993). La formación del heterocarionte en el género *Fusarium*, al igual que ocurre en otros hongos ascomicetos, viene determinada por ciertos *loci* cuyos productos génicos son mediadores en la compatibilidad vegetativa, habiéndose descrito al menos diez *loci* (*het* o *vic*) implicados en esta compatibilidad (Leslie, 1993). La posibilidad de formar un heterocarionte estable se da cuando los alelos de estos *loci* son iguales en las dos estirpes (Leach y Yoder, 1983). Los grupos de compatibilidad vegetativa han servido para estudiar la variabilidad intraespecífica del género (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Ploetz y Correll, 1988; Puhalla, 1985; Woo *et al.*, 1996).

No se descarta la existencia de mecanismos de parasexualidad en los heterocariontes vegetativos, puesto que se han observado procesos de intercambio genético en aislados de *F. oxysporum* que han resultado en reorganizaciones cromosómicas (Ma *et al.*, 2010; Teunissen *et al.*, 2002).

Tipos de patógenos

El género *Fusarium* incluye hongos fitopatógenos que afectan a una amplia variedad de cultivos de gran importancia agrícola. En función del grupo de plantas que se ve afectado por ellas, las especies patógenas del género se dividen en varios grupos:

- Patógenos de gramíneas.

Provocan decaimiento o marchitez en las plantas. En este grupo se incluyen los principales productores de micotoxinas del género siendo capaces de contaminar semillas de cebada, maíz, trigo, etc. Se incluyen en este grupo especies como *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, entre otras.

- Patógenos radiculares.

Son los agentes causales de pudriciones radiculares ocasionando daños de importancia considerable en cultivos de solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas y plantas ornamentales. Además pueden ser patógenos oportunistas de plantas cuyo sistema radicular se encuentre debilitado. *F. solani* es el ejemplo tipo de este grupo de patógenos del género.

- Patógenos vasculares.

Son responsables de la fusariosis vascular, enfermedad que afecta a numerosos cultivos de gran importancia económica (algodón, tabaco, café, leguminosas, cucurbitáceas, plantagináceas, plantas leñosas como la palmera, cultivos de plantas ornamentales como el clavel, el crisantemo o el gladiolo). El ejemplo más destacado dentro de este grupo es *F. oxysporum*.

- Patógenos de postcosecha.

A pesar de que las especies del género *Fusarium* no son conocidas principalmente por los daños ocasionados en postcosecha, muchos de sus miembros son capaces de actuar de este modo cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables. *F. moniliforme* y *F. stilboides* son dos de las especies que se incluyen en este grupo.

3.- *Fusarium oxysporum*: fitopatógeno vascular

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr. es un complejo de especies (FOSC, *Fusarium oxysporum* Species Complex) anamórficas que presentan una variabilidad morfológica y fisiológica considerable (O'Donnell *et al.*, 2009). Es un hongo cosmopolita presente en suelos de todo el mundo, bien creciendo de manera saprofítica o bien colonizando plantas. Está considerado como uno de los diez hongos fitopatógenos más importantes a nivel mundial desde un punto de vista científico y socio-económico (Dean *et al.*, 2012).

Este complejo de especies incluye aislados fitopatógenos conocidos por ser el agente causal de la enfermedad denominada fusariosis vascular. Ésta se manifiesta en la planta en forma de decaimiento, clorosis y marchitez, síntomas resultantes de la colonización de los haces vasculares por parte del hongo.

Se conocen más de 100 especies vegetales susceptibles de ser infectadas por algún aislado del complejo de especies *F. oxysporum* (Michielse y Rep, 2009), algunas de gran importancia económica como la banana (*Musa spp.*), el tomate (*Solanum spp.*), la alubia (*Phaseolus spp.*), el algodón (*Gossypium spp.*) o el guisante (*Pisum spp.*). Precisamente este rango de hospedador se ha utilizado para subdividir al complejo de especies en patógenos específicos denominados formas especiales (ff. spp., *formae speciales*) (Snyder y Hansen, 1940), habiéndose descrito hasta la fecha más de 120 (Di *et al.*, 2016).

Morfología

Los aislados del complejo de especies *F. oxysporum* son capaces de generar esporas de tres tipos (Leslie y Summerell, 2006):

- Microconidios.

Son unicelulares y se producen bajo diferentes condiciones (en cultivo *in vitro* en medios sintéticos, en haces vasculares durante la infección de la planta). Son las esporas más abundantes.

- Macroconidios.

Presentan de tres a cinco células separadas por septos. Generalmente son alargados y ligeramente curvados. Se forman comúnmente durante el desarrollo del hongo sobre la planta ya muerta.

- Clamidosporas.

Son estructuras esféricas, generalmente unicelulares, que se desarrollan a través de modificaciones en la zona terminal de la hifa. Su formación se induce por el envejecimiento del micelio y por condiciones ambientales desfavorables (bajas temperaturas o fuente de carbono limitada, por ejemplo), actuando de este modo como formas de resistencia. Se pueden observar en las fases finales de la colonización (Agrios, 2005).

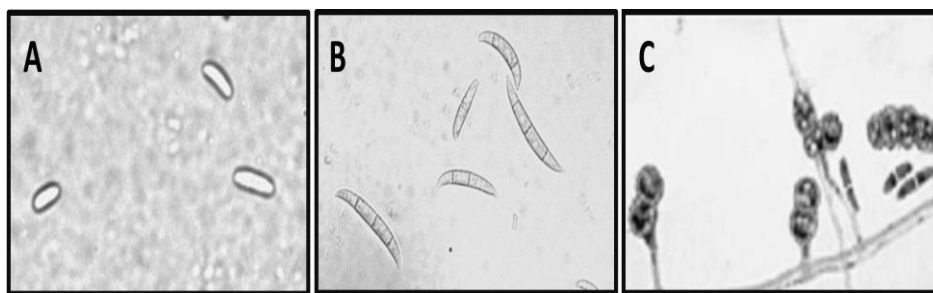


Figura 3. Tipos de esporas del complejo de especies *F. oxysporum*.

A, Microconidios; B, Macroconidios; C, Clamidosporas.

Los cultivos del hongo durante su crecimiento en medios de cultivo *in vitro* forman colonias con un micelio de aspecto algodonoso y pigmentación variable como ocurre en el género *Fusarium* en general. Se propaga en distancias cortas fundamentalmente a través del agua de riego de los cultivos o mediante herramientas de laboreo contaminadas, y en distancias largas se beneficia de un transporte de sus esporas por el viento (Agrios, 2005).

Se conoce sobradamente la inexistencia de estructuras especiales para la infección en los aislados de *F. oxysporum*, produciéndose la entrada en la planta a través de pequeñas heridas o discontinuidades naturales presentes en las raíces vegetales pudiendo alcanzar así el tejido vascular de la planta.

Proceso de infección

El proceso de infección que desarrolla *F. oxysporum* para colonizar la planta se puede dividir en sucesivas fases: (1) reconocimiento de la raíz a través de señales bioquímicas procedentes de la planta huésped, (2) adhesión y colonización de la epidermis radicular, (3) penetración y colonización del parénquima cortical y, en el caso de las estirpes patógenas, degradación de las barreras físicas vegetales como la endodermis para la posterior proliferación en los haces xilemáticos, (4) adaptación al ambiente hostil del interior del hospedador, (5) producción de microconidios, y (6) secreción de péptidos pequeños y fitotoxinas (Di Pietro *et al.*, 2003).

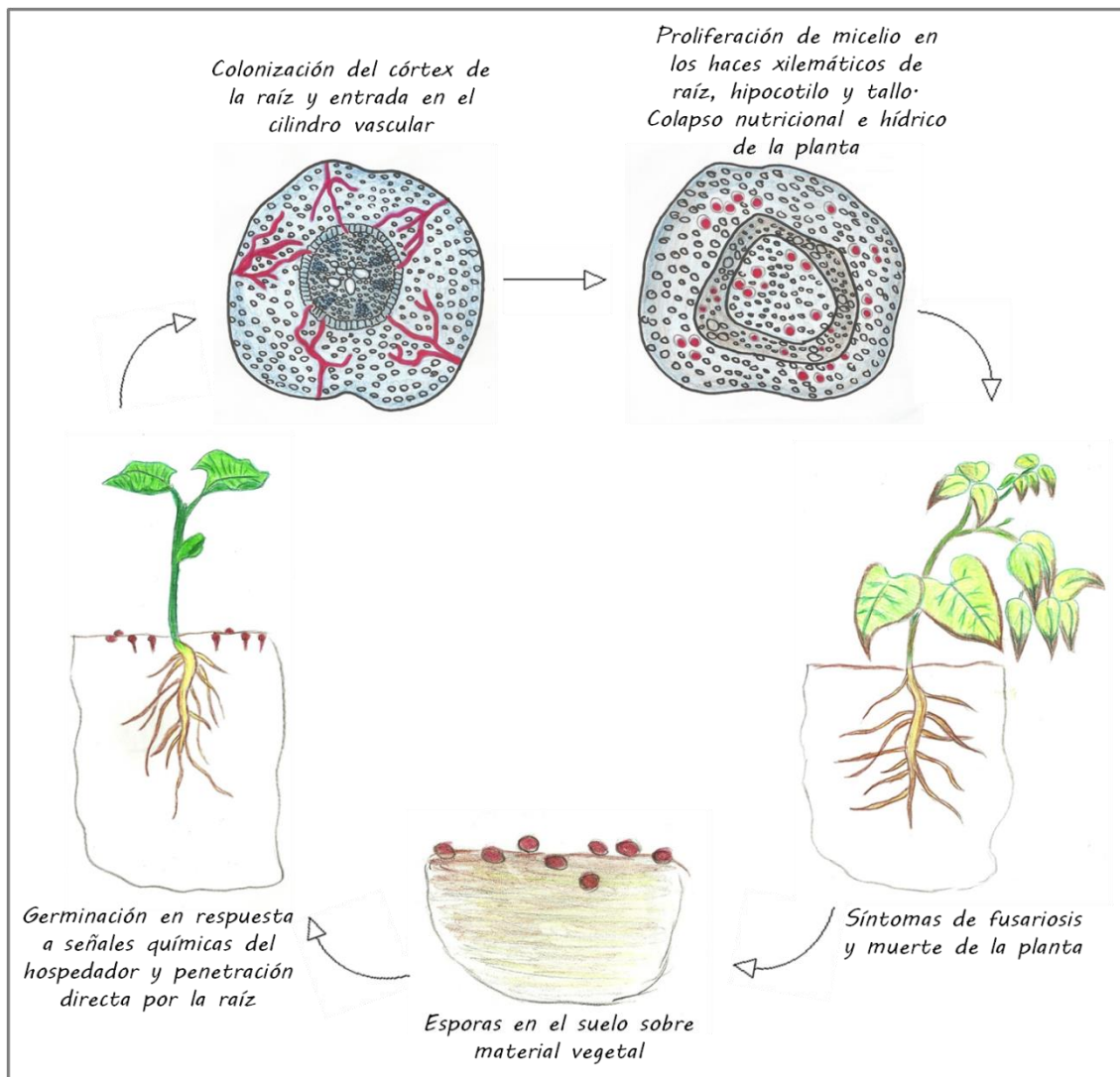


Figura 4. Ciclo de infección de *F. oxysporum*.

Las esporas de *F. oxysporum* se encuentran en el suelo viviendo de forma saprofítica o en forma de clamidospora. En respuesta a señales bioquímicas procedentes de la planta huésped (por ejemplo, la actividad catalítica de enzimas peroxidasa tipo III secretadas por una gran variedad de plantas (Turrà *et al.*, 2015)), son capaces de germinar formando hifas que empiezan a diferenciarse y se adhieren a la superficie radicular de su hospedador. Las hifas terminan por penetrar en las raíces aprovechando heridas naturales existentes en la propia raíz (Nelson, 1981) sin la necesidad de una estructura de infección específica (Jiménez-Fernández *et al.*, 2013; Sarrocco *et al.*, 2007). En ausencia de heridas, se ha observado la preferencia del hongo por penetrar en la raíz a través del ápice radicular (Jiménez-Fernández *et al.*,

2013; Sarrocco *et al.*, 2007) y de las inserciones de los pelos radiculares (Lagopodi *et al.*, 2002; Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

A partir de la entrada del hongo en la planta, se vuelve imprescindible el uso de técnicas de microscopía para hacer un seguimiento del mismo dentro el huésped. Bishop y Cooper fueron los primeros en hacer este seguimiento utilizando para ello microscopía electrónica (Bishop y Cooper, 1983a; Bishop y Cooper, 1983b; Bishop y Cooper, 1984). En la actualidad se recurre generalmente a la observación mediante microscopía láser confocal de estirpes modificadas que expresan proteínas fluorescentes, como es el caso de la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Las observaciones llevadas a cabo en estos trabajos de microscopía permiten concluir que las hifas del hongo, una vez penetran en la raíz, crecen en el córtex de la misma inter e intracelularmente consiguiendo atravesar de manera puntual, mediante la producción de enzimas degradadoras de pared celular (CWDE, *Cell Wall Degrading Enzymes*) (Di Pietro *et al.*, 2003), la endodermis para alcanzar los haces xilemáticos. Situado ya en el sistema vascular y a través de él, el hongo es capaz de colonizar diferentes tejidos de la planta huésped de una forma rápida.

Cuando el hongo ya ha alcanzado los haces vasculares, la infección se completa con acciones de diferente tipo que incluyen producción de pequeñas proteínas efectoras, secreción de fitotoxinas, proliferación de micelio, formación de depósitos de calosa, gomas y tilosas (Beckman, 1987). En cuanto a la importancia que se le otorga a la producción de microconidios durante la infección, las observaciones no son unánimes: en algunos trabajos se ha destacado la relevancia de la producción de microconidios en la infección (Beckman, 1987; Di Pietro *et al.*, 2003), mientras que en trabajos posteriores que han utilizado aislados modificados para expresar la proteína GFP, no se han observado ni conidióforos ni microconidios (Czymmek *et al.*, 2007; van der Does *et al.*, 2008; Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Los trabajos realizados con mutantes nulos en el gen *REN1* (incapaces de producir microconidios y que sólo producen clamidosporas) apoyan esta última alternativa al no haberse observado alteración alguna en la virulencia de estos mutantes (Ohara *et al.*, 2004).

El colapso del xilema provocado por la proliferación de micelio y por la deposición de gomas y mucílagos por la propia planta para detener el avance del

patógeno, resulta en un estrés hídrico del huésped (Hagedorn, 1991) que se manifiesta con una sintomatología típica de fusariosis: decaimiento, marchitez, clorosis, necrosis, pérdida prematura de las hojas, oscurecimiento y retraso en el crecimiento del sistema vascular (Michielse y Rep, 2009). Cuando la planta muere, el micelio se desarrolla en todos sus tejidos, sale al exterior y se producen grandes cantidades de clamidosporas (Agrios, 2005).

Especificidad patógeno – hospedador: las formas especiales

El estudio de la biología de *F. oxysporum* es complejo al no poder distinguir estirpes del hongo con criterios exclusivamente morfológicos y, por tanto, no poder definir qué es una población como tal dentro del complejo de especies *F. oxysporum*. Sin embargo, tradicionalmente las estirpes se han clasificado en patógenos específicos o formas especiales (ff. spp., *formae speciales*) (Snyder y Hansen, 1940). El concepto de forma especial (f. sp., *forma specialis*), aunque carece de valor taxonómico, se utiliza para ordenar de un modo sencillo la gran variabilidad de aislados existentes dentro del complejo de especies *F. oxysporum*. En una forma especial se incluyen todas las estirpes de *F. oxysporum* que son patógenas específicas de un grupo reducido de especies vegetales, de una especie vegetal en particular o, incluso, de una parte concreta de una especie vegetal. Hasta la fecha hay más de 120 formas especiales descritas (Di *et al.*, 2016), algunas de las cuales se encuentran mencionadas en la Tabla 1.

Forma especial (f. sp.)	Hospedador	Forma especial (f. sp.)	Hospedador
<i>albedinis</i>	Palmera datilera	<i>lini</i>	Lino
<i>asparagi</i>	Espárrago	<i>lycopersici</i>	Tomate
<i>betae</i>	Remolacha	<i>medicaginis</i>	<i>Medicago</i>
<i>conglutinans</i>	Berza	<i>melonis</i>	Melón
<i>cubense</i>	Plátano	<i>nicotianae</i>	Tabaco
<i>dianthi</i>	Clavel	<i>phaseoli</i>	Judía, judión
<i>erythroxyli</i>	Coca	<i>pisi</i>	Guisante
<i>fragariae</i>	Fresa	<i>radicis-lycopersici</i>	Tomate (raíz)
<i>gladioli</i>	Gladiolo	<i>tuberosi</i>	Patata
<i>lactucae</i>	Lechuga	<i>vasinfectum</i>	Algodón

Tabla 1. Algunas formas especiales representativas del complejo de especies *Fusarium oxysporum* con sus hospedadores correspondientes.

La combinación del concepto *forma specialis* con la definición tan amplia de *F. oxysporum* a nivel morfológico, ha hecho que durante mucho tiempo se haya considerado a cada forma especial como un grupo monofilético (Leslie y Summerell, 2006) con un único origen; sin embargo, trabajos recientes realizados con marcadores moleculares demuestran que estirpes de la misma forma especial presentan orígenes independientes (Alves-Santos *et al.*, 1999; Baayen *et al.*, 2000; Kistler, 2001; O'Donnell *et al.*, 1998).

Las formas especiales, a su vez, se subdividen en razas en función de la capacidad patogénica de cada estirpe sobre una serie de variedades de la planta huésped (variedades diferenciales). Asimismo, dentro de cada raza se clasifican las estirpes según el grado de virulencia mostrado frente al hospedador (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Kraft y Haglund, 1978; de Vega-Bartol *et al.*, 2011).

Bases genéticas de la patogenicidad de *F. oxysporum*.

Genes conservados en el género *Fusarium*

Entender el proceso de infección de *F. oxysporum* requiere conocer las bases genéticas que subyacen a él, lo que implica llegar a los genes clave que regulan todo el

proceso. Los primeros genes que es necesario conocer son aquellos genes fúngicos que se encuentran bien conservados en otras especies de hongos fitopatógenos y que, por tanto, determinan el estilo de vida de estos organismos. Dentro de este grupo de genes se encuentran los relacionados con las distintas cascadas de señalización: genes codificadores de componentes de la cascada de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (PKA-AMPC); genes codificadores de las subunidades α de la proteína G, *FGA1* y *FGA2* (Jain *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2005), y de la subunidad β *FGB1* (Jain *et al.*, 2003), y genes codificadores de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), como *FMK1* (Di Pietro *et al.*, 2001) y *FOST12* (García-Sánchez *et al.*, 2010). La delección de estos genes determina una reducción acusada de la virulencia sobre plantas huésped, incluso la pérdida completa de patogenicidad como ocurre en los mutantes Δ *FGA2* de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Jain *et al.*, 2005). Esto indica la importancia que tienen estas rutas conservadas en el establecimiento del hongo en la planta.

Otro grupo de genes que son cruciales en el desarrollo de la infección son los genes relacionados con el mantenimiento de la pared celular del hongo, como son los genes *GAS1*, codificador de una β -1,3-glucaniltransferasa (Caracuel *et al.*, 2005), y *RHO1*, codificador de una GTPasa de tipo Rho (Martínez-Rocha *et al.*, 2008). Los productos codificados por ambos genes están implicados en la resistencia del hongo a enzimas de degradación de pared celular secretadas por la planta. Los mutantes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* delecionados en uno u otro gen muestran un fenotipo de virulencia reducida sobre plantas de tomate (Caracuel *et al.*, 2005; Martínez-Rocha *et al.*, 2008).

Se conoce la participación en la virulencia de *F. oxysporum* de otros genes que previamente fueron descritos en otras especies del género. Algunos ejemplos son los siguientes:

- *CLC1*, codificante para una proteína canal de cloruro de importancia en el control del estrés oxidativo al ser necesaria para la completa actividad de enzimas lacasas (Cañero y Roncero, 2008a);
- genes codificadores de quitina sintasas como *CHSV* (Madrid *et al.*, 2003), *CHS2*, *CHSVb* o *CHS7* (Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008);

- y genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs) (Roncero *et al.*, 2000), algunos de los cuales tienen una expresión regulada por un mecanismo de represión catabólica por carbono, como ha sido demostrado en los mutantes delecionados en los genes *SNF1* (Ospina-Giraldo *et al.*, 2003) y *FRP1* (Duyvesteijn *et al.*, 2005) que, además de tener un crecimiento limitado en varios medios con fuentes de carbono simples y complejas como sustrato, muestran una reducción en la expresión de genes codificadores para CDWEs que les impide tener una colonización efectiva de las raíces vegetales durante las primeras fases de la infección (Jonkers *et al.*, 2009).

El proceso de infección está controlado, no sólo mediante regulación por carbono, sino también por una regulación mediada por nitrógeno. Así, la deleción del gen *FNR1*, que codifica para un factor de transcripción considerado como regulador global del metabolismo del nitrógeno, determina una disminución en la capacidad para utilizar fuentes de nitrógeno secundario durante el crecimiento debido a la nula expresión de genes necesarios para la nutrición que se inducen, en condiciones normales, durante las fases más tempranas de la infección, lo que resulta en una pérdida de virulencia (Divon y Fluhr, 2007; Divon *et al.*, 2006).

Parece evidente que las condiciones del medio externo deben tener cierta influencia en el proceso de infección desencadenado por *F. oxysporum*. Además de la importancia que tiene para la infección la disponibilidad de nutrientes en el medio, distintos trabajos han estudiado la respuesta del hongo a otras condiciones externas como es el caso del pH ambiental (Prusky y Yakoby, 2003), pudiendo concluir que el hongo responde a valores altos de pH ambiental a través de una cascada de señalización mediada por el producto codificado por *PacC* que, además, está considerado como un regulador negativo de la patogenicidad (Caracuel *et al.*, 2003).

Genes específicos de *F. oxysporum*

Si bien parece claro que el proceso de infección de los hongos del género *Fusarium* tiene una regulación génica que va esclareciéndose poco a poco, las diferencias observadas entre el proceso de infección del complejo de especies *F. oxysporum* y el de otras especies del género deben estar relacionadas con genes

específicos de *F. oxysporum* no presentes, o bien no expresados, en el resto de especies. El estudio comparativo de los genomas de tres especies emparentadas del género, *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides* y *F. oxysporum*, ha revelado que la mayor parte del genoma en el género *Fusarium* está conservado y se distribuye estructuralmente en el denominado genoma central (*core genome*). Sin embargo existen ciertas regiones específicas (LS, *Lineage-Specific genomic regions*) en *F. oxysporum* que no se encuentran en el genoma de *F. graminearum* o el de *F. verticillioides* (Ma *et al.*, 2010) y que se corresponden con el denominado genoma adaptativo. Estas regiones implican la existencia de una heterogeneidad genómica presente, no sólo entre especies del género *Fusarium*, sino también entre distintas formas especiales de *F. oxysporum*, e incluso se presume que entre distintas razas de una misma forma especial (Guo *et al.*, 2014).

En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* las regiones LS se encuentran distribuidas estructuralmente en cuatro cromosomas completos (3, 6, 14 y 15), denominados cromosomas accesorios, y en pequeñas regiones de otros cromosomas (1 y 2), lo que supone un 40% del total del material genético (Ma *et al.*, 2010). Estas regiones del genoma son ricas en transposones y en genes con orígenes evolutivos distintos, pero siempre relacionados con la patogenicidad, como son efectores y factores de virulencia, factores de transcripción y proteínas involucradas en la transducción de señales (Ma *et al.*, 2010). En este sentido se ha demostrado que el cromosoma 14, uno de los cromosomas correspondientes a las regiones LS del genoma y que ha sido denominado como “cromosoma de patogenicidad” (Ma *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2013; Vlaardingerbroek *et al.*, 2016), puede ser transferido horizontalmente desde una estirpe patógena de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a una no patógena carente de este cromosoma, resultando en una ganancia de patogenicidad de ésta última, en concreto para la infección de tomate (Ma *et al.*, 2010). Aunque el estudio de estas regiones es un campo muy reciente, el trabajo realizado ha permitido plantear la hipótesis de que las regiones LS estén involucradas en la especificidad patógeno-huésped que muestran las distintas formas especiales de *F. oxysporum* al existir diferencias precisamente en estas regiones entre diferentes formas especiales del complejo de especies (Ma *et al.*, 2010).

Parte de los genes cuyos *loci* están ubicados en las regiones LS codifican para factores de virulencia, entre los que se encuentran los genes de avirulencia *AVR1* (sinónimo de *SIX4*), *AVR2* (sinónimo de *SIX3*) y *AVR3* (sinónimo de *SIX1*), descritos en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Las proteínas codificadas por estos tres genes son reconocidas por las codificadas por tres genes de resistencia (*R*) de la planta de tomate denominados, respectivamente, *I-1*, *I-2* e *I-3* (Houterman *et al.*, 2008; Houterman *et al.*, 2009; Rep *et al.*, 2004).

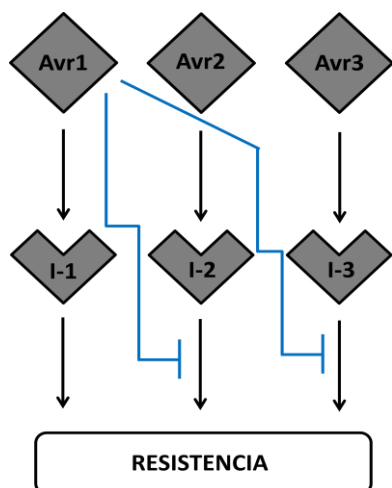


Figura 5. Representación esquemática de las interacciones entre las proteínas Avr e I en la interacción *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* – tomate. Las flechas indican activación, las líneas acotadas por una línea cruzada indican supresión (Modificado de Houterman *et al.*, 2008).

Estos tres genes de avirulencia están localizados en el cromosoma 14 junto con otros once genes candidatos a codificar proteínas efectoras (Schmidt *et al.*, 2013). Las proteínas codificadas por estos catorce genes fueron encontradas en la savia xilemática de la planta infectada, por lo que se les dio el nombre de proteínas secretadas en el xilema o SIX (*Secreted In Xylem*), desde SIX 1 a SIX14 (Houterman *et al.*, 2007). Todas son proteínas pequeñas de no más de 200 residuos aminoacídicos y enriquecidas en residuos de cisteína (al menos cuatro) (Ma *et al.*, 2010).

SIX1 (*Avr3*) fue la primera proteína de este grupo en ser identificada siendo localizada en la savia del xilema de plantas de *Solanum lycopersicum* L. (Rep *et al.*, 2002; Rep *et al.*, 2005). Tiene un tamaño de 32 kDa y es reconocida por la proteína de resistencia I-3 del tomate (Rep *et al.*, 2004). La expresión de *SIX1* se ha detectado en etapas tempranas de la infección y se ha demostrado que la presencia del efector homónimo es necesaria para una virulencia completa del hongo (Rep *et al.*, 2005), aunque se desconoce su mecanismo de acción (de Sain y Rep, 2015).

La proteína SIX3 (Avr2) es exclusiva de la forma especial *lycopersici*, tiene un tamaño de 18 kDa y es reconocida por la proteína de resistencia I-2 del tomate (Houterman *et al.*, 2009). La expresión del gen *SIX3* se produce fundamentalmente durante el crecimiento del hongo en los haces del xilema, e igual que sucede con SIX1, la presencia de SIX3 también es necesaria para la completa virulencia en plantas de tomate (Houterman *et al.*, 2009). SIX3 es capaz de formar homodímeros en el núcleo y el citoplasma de las células del hospedador, así como heterodímeros con SIX5 en el núcleo, citoplasma y en la periferia celular en forma de cúmulos (Ma *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015). Se ha planteado la hipótesis de que la dimerización y la localización de los dímeros SIX3-SIX5 sea clave para incrementar la virulencia, a pesar de no conocerse cuál es el mecanismo de acción ni de SIX3 ni de SIX5 (de Sain y Rep, 2015).

SIX6 es una proteína de 23 kDa también presente en especies del género *Colletotrichum* (Gawehns *et al.*, 2014) que, al igual que SIX1 y SIX3, es requerida para una completa virulencia en *F. oxysporum*. Aunque su mecanismo de acción también es desconocido, se ha propuesto que suprime la respuesta de defensa de la planta mediada por muerte celular programada (Gawehns *et al.*, 2014).

A diferencia de lo que ocurre con las proteínas SIX descritas anteriormente, la proteína SIX4 (Avr1) no es necesaria para una completa virulencia del hongo en variedades susceptibles de tomate, a pesar de estar descrito como un elemento supresor de los mecanismos de resistencia basados en las proteínas de resistencia I-2 e I-3 (Houterman *et al.*, 2008).

Hasta la fecha no se conoce la función del resto de proteínas SIX (SIX2, SIX7-SIX14) ni tampoco el fenotipo mostrado por el hongo tras la delección de los genes que las codifican (de Sain y Rep, 2015).

La especificidad de hospedador implícita en el concepto de forma especial no viene determinada exclusivamente por genes ubicados en las regiones LS del genoma, se ha descrito también que *loci* ubicados en el genoma central, región no específica y conservada en las especies del género *Fusarium*, están involucrados directa o indirectamente en la regulación de la patogenicidad y la especificidad de hospedador. Es el caso de *SGE1* (*SIX Gene Expression 1*), gen codificante para un factor de transcripción que, si bien no es necesario para la penetración y la colonización

radicular, sí es necesario para el crecimiento parasítico del hongo dentro de su huésped natural, y es, además, imprescindible para la expresión de algunos genes codificadores de efectores durante el proceso de infección como ocurre con los genes *SIX* (*SIX1*, *SIX2*, *SIX3* y *SIX5*) (Michielse *et al.*, 2009a; Vlaardingerbroek *et al.*, 2016).

Por otro lado se han descrito familias génicas cuyos miembros, codificantes para proteínas implicadas en la regulación de la patogenicidad y virulencia en *F. oxysporum*, están ubicados tanto en el genoma central como en regiones LS del genoma. En este sentido, recientemente se ha propuesto que algunos de los factores de transcripción codificados en el cromosoma 14 de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presentan funciones similares, si no iguales, que sus homólogos codificados en regiones del genoma central, lo que sugiere la existencia de conexiones transcripcionales entre el genoma adaptativo y el genoma central al menos en lo que a regulación de patogenicidad y virulencia se refiere (van der Does *et al.*, 2016).

En el grupo de genes con homólogos en el genoma central y en el adaptativo, destacan los agrupados en las familias génicas *FOW2*, *EBR* y *FTF*, todas ellas codificadoras para factores de transcripción (Tabla 2).

FOW2 es un gen conservado en las distintas formas especiales de *F. oxysporum* y todos los genomas de las formas especiales disponibles hasta la fecha poseen una copia de él. Codifica para un factor de transcripción con dominio de unión al ADN tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$, dominio específico de hongos. Los mutantes interrumpidos en este gen en la forma especial *lycopersici* muestran una reducción de virulencia de aproximadamente un 50% (Michielse *et al.*, 2009b), observándose una pérdida total de patogenicidad en los mutantes $\Delta FOW2$ en la forma especial *melonis* (Imazaki *et al.*, 2007). En la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *FOW2* se localiza en el cromosoma 2 (genoma central) y tiene dos parálogos ubicados en los cromosomas accesorios 3 y 6 (regiones LS).

Al contrario que *FOW2*, *EBR1* (*Enhanced Branching*) no es un gen exclusivo de *F. oxysporum*. Fue caracterizado por primera vez en *F. graminearum* (Dufresne *et al.*, 2008) en cuyo genoma está presente en forma de copia única. Este gen codifica también para otro factor de transcripción con dominio de unión al ADN tipo dedo de

zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$. En *F. graminearum* este factor de transcripción es necesario para un crecimiento radial normal y durante la fase patogénica del hongo en la espiga del trigo al haberse observado una reducción de virulencia en mutantes nulos en el gen (Zhao *et al.*, 2011); por su parte, en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* la delección de *EBR1* determina un fenotipo de crecimiento limitado y una reducción de virulencia (Zhao *et al.*, 2011), igual que ocurre en las estirpes patógenas MM10, MN-25, 007, Df023 y Df038 de la misma forma especial. La delección del gen en la estirpe no patógena Fo47 también determina un crecimiento anómalo, si bien de una forma más moderada que en las estirpes patógenas, y además una reducción de la capacidad de biocontrol (Jonkers *et al.*, 2014). A diferencia de lo que ocurre en *F. graminearum*, en las estirpes patógenas de *F. oxysporum* existen parálogos de *EBR1*, en concreto en el genoma de la estirpe 4287 de la forma especial *lycopersici* hay seis parálogos (Zhao *et al.*, 2011): la copia homóloga de la caracterizada en *F. graminearum* (*EBR1*) se localiza en el cromosoma 7 del genoma central y el resto de copias (*EBR2*, *EBR3* y *EBR4*) en regiones LS (Jonkers *et al.*, 2014).

Los análisis de *microarrays* llevados a cabo tanto en *F. graminearum* como en *F. oxysporum* han permitido concluir que *EBR1* regula genes implicados en metabolismo, defensa y virulencia del hongo. El mecanismo de regulación difiere de una especie a otra: en *F. graminearum* la regulación que ejerce *EBR1* sobre el metabolismo del carbono es positiva, mientras que la que ejerce sobre genes relacionados con la defensa es negativa. En *F. oxysporum*, por su parte, la regulación de genes involucrados en vías de defensa celular (factores de virulencia, toxinas, proteínas de resistencia) es positiva, mientras que la de genes relacionados con el metabolismo general y el transporte celular es negativa (Jonkers *et al.*, 2014).

La familia génica *FTF* (*Fusarium Transcription Factor*) también se encuentra en expansión en las regiones LS del genoma de *F. oxysporum* y, al igual que *FOW2* y *EBR1*, sus miembros codifican para factores de transcripción con dominio de unión al ADN de tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$. De los genes *FTF*, *FTF1* fue el primero en ser identificado. Fue descrito por primera vez en las estirpes muy virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Ramos *et al.*, 2007) como parte estructural de un SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) diseñado específicamente para el

diagnóstico y la detección de estirpes muy virulentas de esta forma especial en cultivos de *Phaseolus vulgaris* L. (Alves-Santos *et al.*, 2002b). Las hibridaciones de tipo *Southern blot* llevadas a cabo con ADN de diferentes aislados de la forma especial *phaseoli* permitieron identificar un segundo gen de la familia *FTF* homólogo a *FTF1*, denominado *FTF2* y que está presente en estirpes patógenas con distinto grado de virulencia y en estirpes no patógenas de *F. oxysporum* (Ramos, 2005). Estudios posteriores demostraron que *FTF2* es un gen altamente conservado presente en ascomicetos filamentosos de distintos géneros (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). La homología existente entre *FTF2* y *FTF1* es de un 80-85% en la región codificante y un 55-65% en la región promotora (Ramos, 2005). Es precisamente la menor homología en la región promotora la que se propone como explicación para las diferencias observadas en los niveles y el momento de expresión de ambos genes, siendo para *FTF1*, al contrario que para *FTF2*, abundante y específica durante la colonización de la planta (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007).

Además de las diferencias existentes en cuanto a secuencia nucleotídica, se han observado diferencias en el número de copias existentes de ambos genes. *FTF2* es un gen de copia única, en tanto que *FTF1* es un gen multicopia con un número de copias variable (parálogos) en las distintas estirpes de *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Se ha demostrado, trabajando con estirpes de la forma especial *phaseoli*, que el número de copias y el nivel de expresión está correlacionado con el grado de virulencia de los aislados (de Vega-Bartol *et al.*, 2011). En la estirpe 4287 de la forma especial *lycopersici* se han anotado 11 copias homólogas a la familia *FTF*, una de ellas tiene una homología cercana al 100% con *FTF2* y se localiza en el cromosoma 9, correspondiente al genoma central; el resto de copias homólogas de la familia presentan homologías variables con *FTF1* y sus *loci* se localizan en regiones LS del genoma (de Vega-Bartol *et al.*, 2011; Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

Gen	Locus	Cromosoma	Gen	Locus	Cromosoma	Gen	Locus	Cromosoma
<i>FOW2</i>	FOXG_06378	2	<i>EBR1</i>	FOXG_05408	7	<i>FTF2</i>	FOXG_09390	9
<i>FOW2</i>	FOXG_12458	3	<i>EBR2</i>	FOXG_14277	14	<i>FTF1</i>	FOXG_15059	1
<i>FOW2</i>	FOXG_21393	6	<i>EBR3</i>	FOXG_06927	3	<i>FTF1</i>	FOXG_12539	3
			<i>EBR3</i>	FOXG_16083	3	<i>FTF1</i>	FOXG_12589	3
			<i>EBR3</i>	FOXG_16295	6	<i>FTF1</i>	FOXG_14000	6
			<i>EBR4</i>	FOXG_12561	3	<i>FTF1</i>	FOXG_17084	6
			<i>EBR4</i>	FOXG_12612	3	<i>FTF1</i>	FOXG_17123	6
			<i>EBR4</i>	FOXG_13979	6	<i>FTF1</i>	FOXG_14257	14
			<i>EBR4</i>	FOXG_17064	6	<i>FTF1</i>	FOXG_16414	14
						<i>FTF1</i>	FOXG_17458	14
						<i>FTF1</i>	FOXG_14422	14

Tabla 2. Localización cromosómica de los miembros de las familias génicas *FOW2*, *EBR* y *FTF* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La copia de cada familia génica localizada en el genoma central se destaca con un sombreado verde; las copias localizadas en las regiones LS se destacan con un sombreado blanco (tomado de Niño-Sánchez, 2016).

Los estudios sobre las bases genéticas que subyacen a los procesos de infección y a la especificidad patógeno-hospedador en el complejo de especies *F. oxysporum* se han visto facilitados desde 2007 cuando se dispuso por primera vez de la secuencia completa del genoma de una estirpe de *F. oxysporum*. La secuencia del genoma de *F. oxysporum* fue incluida, junto con la de otros miembros del género *Fusarium*, en el proyecto *Broad Institute* del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) que, con su creación, pretendía hacer accesibles los genomas a la comunidad científica de una forma abierta y gratuita para usarlos en análisis genómicos. Gracias a este proyecto se han llevado a cabo estudios genéticos comparativos entre distintos miembros del género *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*) (Ma *et al.*, 2010) y entre ciertas formas especiales del complejo de especies *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). A día de hoy la información incluida en el mencionado proyecto ha sido transferida a la base de datos *Joint Genome Institute*

(JGI) que permite llevar a cabo trabajos equivalentes a los que se venían realizando con la ayuda del *Broad Institute*.

NRRL	Estirpe	Forma especial	Género hospedador	Tamaño	Genes	Cromosomas
37622	HDV247	<i>pisi</i>	<i>Pisum</i>	55,19	19.623	15
54002	Fo47	(biocontrol)		49,66	18.191	12
32931	FOSC 3-a	(humano)	<i>Homo</i>	47,91	17.280	15
26381	CL57	<i>radicis-lycopersici</i>	<i>Solanum</i>	49,36	18.238	*
34936	4287	<i>lycopersici</i> (raza 2)	<i>Solanum</i>	61,36	20.925	15
54003	MN25	<i>lycopersici</i> (raza 3)	<i>Solanum</i>	48,64	17.931	13
54005	PHW815	<i>raphani</i>	<i>Raphanus/Arabidopsis</i>	53,50	19.306	*
54006	II5	<i>cubense</i> (raza tropical 4)	<i>Musa</i>	46,55	16.634	*
25433		<i>vasinfectum</i>	<i>Gossypium</i>	52,91	18.905	*
	Fo5176		<i>Arabidopsis</i>	54,95	21.087	*
26406		<i>melonis</i>	<i>Cucurbita</i>	54,03	19.661	*
54008	PHW808	<i>conglutinans</i> (raza 2)	<i>Brassica/Arabidopsis</i>	53,58	19.854	*

Tabla 3. Información de la estructura genómica de las formas especiales de *F. oxysporum* secuenciadas y depositadas en el proyecto *Broad Institute*. NRRL, código de la colección de aislados del ARS (*Agricultural Research Service*); el tamaño de los genomas está indicado en Mb; se indica con * la información no disponible hasta la fecha (tomado de Niño-Sánchez, 2016).

4.- *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick y W.C. Snyder es el agente causal de la traqueomicosis o fusariosis vascular en plantas del género *Phaseolus* como la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) o el judión o ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). La primera descripción de la fusariosis vascular de la judía la llevó a cabo Harter en 1929 en California (Harter, 1929); sin embargo la caracterización del patógeno fue llevada a cabo años más tarde por Kendrick y Snyder en 1942 (Kendrick y Snyder, 1942).

La sintomatología observada en plantas afectadas por fusariosis vascular es la misma que la descrita para otras enfermedades producidas por distintos miembros del

complejo de especies *F. oxysporum* e incluye procesos de amarilleamiento, clorosis y decaimiento de la planta. De igual modo que se describió anteriormente para el complejo de especies en general, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* penetra en la planta a través de la raíz y el hipocotilo aprovechando heridas naturales en los mismos para multiplicarse posteriormente en el tejido vascular de la planta hasta colapsarlo. Aunque la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de aproximadamente 20°C, se ha descrito que el máximo desarrollo de biomasa fúngica se produce a 28°C (Hagedorn, 1991).

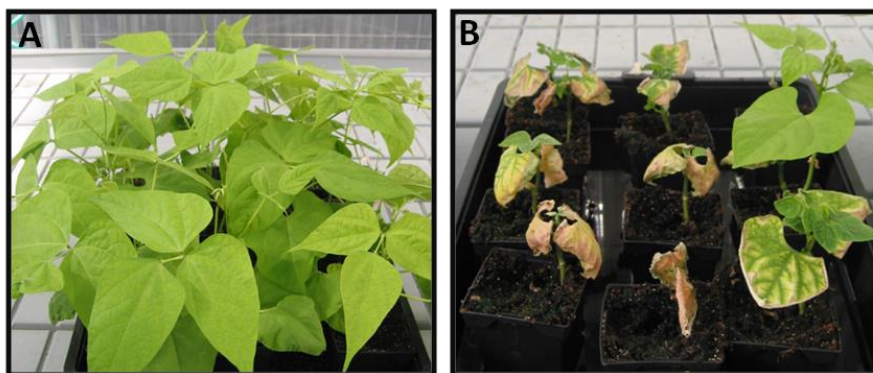


Figura 6. Comparación sintomática en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. A, Plantas sanas; B, Plantas infectadas por un aislado muy virulento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Al igual que ocurre en otras formas especiales, en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se ha establecido una clasificación de los aislados en razas en función de su capacidad patogénica sobre una serie de variedades diferenciales de judía (Tabla 4) (Aloj *et al.*, 1987; Alves-Santos *et al.*, 2002a; Gordon y Martyn, 1997), habiéndose identificado hasta el momento siete razas:

- Raza 1. Carolina del Sur (E.E.U.U.) (Ribeiro y Hagedorn, 1979).
- Raza 2. Brasil (Ribeiro y Hagedorn, 1979).
- Raza 3. Colombia (Pastor-Corrales y Abawi, 1987).
- Raza 4. Colorado (E.E.U.U.) (Salgado y Schwartz, 1993).
- Raza 5. Grecia (Woo *et al.*, 1996).
- Raza 6. España (Alves-Santos *et al.*, 2002a).
- Raza 7. Grecia (Alves-Santos *et al.*, 2002a).

	Raza 1	Raza 2	Raza 3	Raza 4	Raza 5	Raza 6	Raza 7
A211	S	S	R	S	S	S	R
BAT477	S	R	R	S	S	S	S
CALIMA	R	R	S	S	R	S	S
IPA 1	R	S	R	S	S	S	R
HF-465-53-1	R	R	R	R	R	S	R

Tabla 4. Estudio de la resistencia / susceptibilidad de variedades diferenciales de *Phaseolus vulgaris* L. frente a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. S: susceptibilidad (en amarillo); R: resistencia (en verde).

La importancia de la fusariosis vascular producida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* y la amplia distribución del patógeno han quedado demostradas en los numerosos trabajos que han estudiado este hongo y la enfermedad en diferentes regiones del mundo (Buruchara y Camacho, 2000). Dada la importancia del cultivo de la judía a nivel mundial y las pérdidas de producción derivadas de esta enfermedad, se están dedicando importantes esfuerzos a la búsqueda de variedades de judía resistentes así como al estudio de las bases moleculares que subyacen a esa resistencia (Cross *et al.*, 2000; de Vega-Bartol *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2007; Ribeiro y Hagedorn, 1979; Salgado *et al.*, 1994; Salgado *et al.*, 1995).

Importancia de la fusariosis vascular en la judía de El Barco de Ávila

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie de la familia *Leguminosae*, autógama y de germinación epigea. Su cultivo con fines alimentarios es muy antiguo, existiendo registros arqueológicos en Perú y México que datan de 8.000 y 7.000 a.C., respectivamente (Michaelis, 1991). Está considerado como un alimento de bajo coste, rico en proteínas y carbohidratos, con un balance desigual de aminoácidos cuando se consume en estado seco (presenta carencia de aminoácidos azufrados y tiene cantidades excesivas de lisina).

Las variedades de judía común cultivadas son plantas herbáceas anuales, de crecimiento determinado, cuyas semillas son muy variables en tamaño, forma y color

en función de la variedad. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 15,6 y 21,1°C, siendo capaz de soportar temperaturas máximas de 27°C y mínimas de 10°C (Michaelis, 1991).

En España la producción de judía seca en 2015 alcanzó las 18.200 toneladas en una superficie cultivada de unas 8.900 hectáreas, de las que un 32% corresponde a los cultivos localizados en la comunidad autónoma de Castilla y León que suponen un 31% de la producción total española (www.magrama.gob.es).

España cultiva una amplia gama de variedades de judía, algunas muy apreciadas por el consumidor debido a sus propiedades organolépticas. Entre las variedades más valoradas están las judías de El Barco de Ávila (Ávila, Castilla y León), acogidas a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Judía de El Barco” que incluye las variedades Riojana o Blanca Riñón, Blanca Redonda, Plancheta o Planchada, Morada Larga, Morada Redonda, Arroquina y Judiión de El Barco.

La comarca de El Barco de Ávila se encuentra situada en el suroeste de la provincia de Ávila, en la ladera norte de la Sierra de Gredos, a 1.000 metros de altitud aproximadamente. A pesar de ser una región con una pequeña extensión de superficie cultivada y con baja producción, aún mantiene la judía como cultivo tradicional y desde 1989 posee la categoría de Denominación de Calidad, algo muy apreciado en los mercados gastronómicos. Quizás ha sido este aspecto el que ha frenado la tendencia a la baja en superficie cultivada y en la producción observada en las décadas de los años 80 y 90, incrementándose la superficie cultivada inscrita en la IGP europea hasta superar las 200 hectáreas y la producción hasta superar los 125.000 kg (Consejo Regulador de la IGP “Judías de El Barco”). Parte de las razones que explican la producción de semillas de tan elevado valor por su sabor y textura se encuentran en las características del clima, continental muy acusado, y en el tipo de suelo de la región de El Barco de Ávila. Los suelos de esta región son ácidos, con un pH variable entre 4,5 y 6, ligeros y bien constituidos, sin problemas de drenaje, con bajo contenido en calcio y fósforo, un contenido variable en nitrógeno y potasio, alto porcentaje de materia orgánica, y unas excelentes condiciones físicas de aireación y permeabilidad; esto, unido a la calidad de sus aguas, exentas de cal, permiten alcanzar unas condiciones

óptimas para la cocción de las semillas y buenas propiedades organolépticas del producto.

El problema sanitario más importante padecido por el cultivo de la judía en El Barco de Ávila es la fusariosis vascular producida por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Díaz-Mínguez *et al.*, 1996), enfermedad también conocida a nivel local en la comarca como “quema” o “rastrojera”. No es una enfermedad reciente y su importancia fue reconocida ya en 1926 cuando se llevó a cabo un estudio para valorar los daños causados en las cosechas de judía de esta zona (Benlloch y Cañizo, 1926). Se sugiere que la incidencia de la enfermedad en esta comarca se ha visto favorecida por la conjunción de varios aspectos: suelos ácidos, abundancia de agua para el riego y los métodos tradicionales de laboreo.

Hace diecisiete años nuestro grupo de investigación comenzó a realizar inspecciones sistemáticas y periódicas de campos de judías de los alrededores de El Barco de Ávila y de los pueblos colindantes de la comarca (La Carrera, Solana de Ávila, Navalanguilla, Tormellas, Bohoyo, Los Llanos de Tormes, etc.) con el fin de establecer una caracterización genética firme y fiable de las estirpes de *F. oxysporum* capaces de infectar judía (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (Alves-Santos *et al.*, 1999; Díaz-Mínguez *et al.*, 1996), pudiendo así desarrollar métodos moleculares para el diagnóstico de la fusariosis vascular ocasionada por estas estirpes (Alves-Santos *et al.*, 2002b). De esta forma se recogieron más de 140 aislados de *F. oxysporum*, muchos de ellos no patógenos. Los aislados patógenos recogidos, todos pertenecientes a la raza 6 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, presentan distintos grados de virulencia que se manifiestan en diferencias en la rapidez y gravedad de los síntomas con los que cursa la enfermedad causada en variedades españolas de *P. vulgaris* (Alves-Santos *et al.*, 2002a). Así se distingue un grupo de estirpes muy virulentas y otro de estirpes poco virulentas, que pueden discriminarse utilizando un marcador genético de tipo SCAR, descrito por nuestro grupo de investigación, sólo presente en las estirpes muy virulentas; esto permite un diagnóstico rápido de la enfermedad mediante PCR incluso en plantas asintomáticas (Alves-Santos *et al.*, 1999; Alves-Santos *et al.*, 2002b).

5.- Las interacciones planta-patógeno

Las plantas están sometidas a un constante ataque por parte de distintos patógenos y para frenar las infecciones provocadas por éstos, han desarrollado una serie de mecanismos de defensa, bien generales contra grupos amplios de patógenos, bien específicos contra un grupo concreto. Por su parte, los patógenos han evolucionado desarrollando estrategias para superar las defensas del hospedador y lograr una infección efectiva. El balance entre los mecanismos defensivos de las plantas y las estrategias para superarlos de los patógenos determina el tipo de interacción entre unas y otros. Así, se considera que las interacciones planta-patógeno son compatibles (virulentas) cuando las condiciones son favorables para el patógeno y éste es capaz de superar los mecanismos de defensa de la planta llegando a completar el proceso de infección; mientras que son incompatibles (avirulentas) en los casos en los que los mecanismos de defensa de la planta funcionan eficazmente impidiendo la entrada del patógeno o su establecimiento y evitando así que la infección progrese.

El éxito de las infecciones también depende de otros factores ajenos a la planta y al patógeno, tanto bióticos (competencia entre los microorganismos de la rizosfera, por ejemplo) como abióticos (temperatura ambiental, grado de humedad, etc.).

Respuesta defensiva de la planta frente a *F. oxysporum*

Las plantas han desarrollado un sistema inmunitario altamente eficaz para hacer frente a las infecciones por patógenos, un sistema que aunque presenta grandes diferencias con el sistema inmune de vertebrados, sorprendentemente también presenta algunas similitudes. A diferencia de lo que ocurre en vertebrados, las plantas disponen exclusivamente de un sistema inmune innato (Akira *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006; Nürnberger *et al.*, 2004) para conseguir una defensa temprana. Este sistema inmune vegetal lo conforman dos grupos de mecanismos, ambos específicos de cada especie vegetal: un grupo de mecanismos constitutivos o preexistentes, y otro grupo de mecanismos inducibles.

Mecanismos de defensa constitutivos

Los mecanismos de defensa constitutivos están asociados a condiciones preexistentes en la planta que incluyen características estructurales de la misma (cutinas, suberinas, ceras, ligninas y tricomas) que actúan a modo de barreras físicas estáticas protegiendo a las plantas, además, frente a la deshidratación y otros estreses abióticos (Dangl y Jones, 2001; Koeck *et al.*, 2011). Dentro de estos mecanismos también se encuentran ciertos compuestos del metabolismo secundario sintetizados de una forma relativamente constante (algunos terpenos, fenoles, flavonoides, isoflavonoides, glucosinatos, glicósidos, cianogénicos y aminoácidos no proteicos) que ofrecen una defensa inicial frente al ataque de patógenos (Dotor Robayo y Cabezas Gutiérrez, 2014). Esta estrategia defensiva es capaz de prevenir algunas enfermedades, pero es insuficiente para lograr una protección completa de la planta al existir patógenos capaces de superarla.

Mecanismos de defensa inducibles

Este tipo de mecanismos es el que se desencadena como respuesta al ataque de un patógeno. Para su activación se requiere que la planta detecte al patógeno, algo que se produce gracias a la presencia en las células microbianas de determinadas moléculas, denominadas elicitores o, más recientemente, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Jones y Dangl, 2006; Newman *et al.*, 2013). Los elicitores suelen ser moléculas altamente conservadas y esenciales para el ciclo de vida del patógeno, entre las que se incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos o pequeñas moléculas como el ATP. En el caso de hongos y oomicetos se han descrito como PAMPs: oligómeros de quitina (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007), ácidos eicosa-poliénicos (Savchenko *et al.*, 2010), β -glucanos (Klarzynski *et al.*, 2000), ramnolípidos (Sanchez *et al.*, 2012), xilanasas (Ron y Avni, 2004), la proteína Ave1 (de Jonge *et al.*, 2012), proteínas inductoras de necrosis o NLPs y los cerebrósidos A y C (Boller y Felix, 2009; Postel y Kemmerling, 2009). Debido a su relevancia funcional, la variabilidad de estas moléculas es inferior al resto de moléculas del patógeno, lo que explica que sean utilizadas tanto por plantas como por animales como “huellas” indicadoras de la presencia del patógeno (Bittel y Robatzek, 2007; Nürnberger y Brunner, 2002). Las

plantas también son capaces de detectar como elicitores, pequeños compuestos endógenos o DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) liberados a partir de moléculas o estructuras de mayor tamaño por la acción de enzimas producidas durante la invasión del patógeno, como ocurre con los monómeros de cutina, oligogalacturónidos, sisteminas o celodextrinas procedentes de la pared celular vegetal (Boller y Felix, 2009; Brutus *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2013; Galletti *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2014).

Los elicitores son reconocidos en la planta por proteínas receptoras de superficie o PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), reconocimiento que desencadena en la propia planta un conjunto de defensas basales conocido como Inmunidad Desencadenada por PAMPs (PTI, *PAMPs Triggered Immunity*) (Dodds y Rathjen, 2010; Jones y Dangl, 2006; Zeilinger *et al.*, 2016). La inmunidad de tipo PTI es una defensa temprana que engloba una amplia variedad de respuestas a todos los niveles entre las que se incluyen el cierre de estomas, un flujo rápido y una movilización de iones calcio desde las reservas internas, producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), expresión de genes relacionados con la inmunidad, deposición de calosa en los sitios de infección reforzando la pared celular al formar estructuras conocidas como papilas (Boller y Felix, 2009; Nürnberger *et al.*, 2004; Scheler *et al.*, 2013). En la mayor parte de las interacciones planta-patógeno, la inmunidad de tipo PTI es suficiente para detener el crecimiento del patógeno, habiéndose demostrado una mayor susceptibilidad a ellos en plantas defectuosas en los receptores PRRs o en otros componentes de la señalización de esta inmunidad (Roux *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). En el caso de la interacción específica entre *Fusarium oxysporum* y *Arabidopsis thaliana* se han identificado, en el genoma del ecotipo Col-0, seis *loci* de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *matthioli* denominados *RFO* (*Resistance to Fusarium oxysporum*) (Diener y Ausubel, 2005). De los seis, el principal es *RFO1*, que codifica para la proteína quinasa WAKL22, asociada a pared celular y perteneciente a la familia de receptores semejantes a quinasas (RLK, *Receptors-Like Kinases*) (Johnson e Ingram, 2005). *RFO1* además de conferir resistencia frente a la forma especial *matthioli*, también lo hace frente a otras formas especiales como *raphani* y *conglutinans*, lo que indica que no es una resistencia

específica de raza (Diener y Ausubel, 2005). Se ha descrito que *RFO1* es también esencial en *A. thaliana* para la resistencia frente a *Verticillium longisporum*, hongo filamentoso con una estrategia de infección similar a la de *F. oxysporum* (Johansson *et al.*, 2006).

La relevancia biológica que tiene la respuesta defensiva de tipo PTI en las interacciones planta-patógeno ha quedado demostrada en distintos trabajos en los que se confirma la necesidad que tienen los patógenos adaptados de evadir o suprimir esta respuesta para poder llevar a término su proceso de infección (Dodds y Rathjen, 2010; Dou y Zhou, 2012; Macho y Zipfel, 2014). Para suprimir dicha respuesta defensiva primaria, los patógenos, una vez la detectan, comienzan a sintetizar factores de virulencia conocidos como efectores, lo que provoca en la planta un estado de susceptibilidad (ETS, *Effector Triggered Susceptibility*). Diversos trabajos han demostrado que los efectores controlan distintas funciones celulares en el huésped, y en el caso concreto de hongos fitopatógenos modulan la expresión de genes de defensa y son capaces de reprogramar el metabolismo de los tejidos colonizados durante fases específicas de la infección (Doehlemann *et al.*, 2014; O'Connell *et al.*, 2012). Como mecanismo de respuesta frente a los efectores, las plantas desarrollan una segunda etapa defensiva conocida como Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI, *Effector Triggered Immunity*), basada en el reconocimiento específico de los mismos (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006) mediante proteínas receptoras del tipo NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeat*). En su mayoría, las proteínas receptoras son citoplasmáticas y su unión con los efectores permite que se reactiven las defensas inducibles del huésped. De un modo general, los receptores se conocen como proteínas de resistencia (R) y los efectores detectados por ellas como proteínas de avirulencia (AVR) (Dodds y Rathjen, 2010), ajustándose al modelo de resistencia “Gen a gen” descrito previamente por Flor (Flor, 1971). La interacción entre ambas proteínas se da a través de una asociación física, que en el caso de patógenos de tipo fúngico es directa.

De forma específica, en la interacción *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* - *Solanum lycopersicum* los genes de resistencia *I* (de Inmunidad a la fusarioris) son de vital importancia para la respuesta defensiva de la planta. Se han descrito seis *loci I* en

plantas de tomate, algunos de ellos codificantes para proteínas de la subclase NBS-LRR. Los motivos LRR, implicados en las interacciones proteína-proteína, permiten la interacción de las proteínas receptoras con las proteínas de avirulencia (AVR), tal y como ocurre con AVR1 (SIX4), AVR2 (SIX3) y AVR3 (SIX1) (Houterman *et al.*, 2008).

Las estrategias defensivas activadas por la respuesta de tipo ETI desencadenada tras la detección de los efectores son más rápidas y fuertes que las derivadas de la inmunidad PTI. Entre estas estrategias se encuentra la Respuesta Hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*) (Jones y Dangl, 2006) que incluye producción de ROS y muerte celular programada en el lugar de infección evitando la diseminación del patógeno (Spoel y Dong, 2012). Todo este conjunto de respuestas defensivas pueden, finalmente, desencadenar en un estado de activación constitutivo de las defensas sistémicas de la planta conocido como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) (Ross, 1961) que puede durar desde semanas a meses. Esta respuesta sistémica activa una serie de mecanismos que limitan el crecimiento de los patógenos y suprime el desarrollo de la sintomatología característica de la enfermedad en partes no infectadas de la planta, de forma que éstas se vuelven más resistentes a distintos patógenos (virus, bacterias, hongos) (Hammerschmidt, 1999; Kuć, 1982; Ryals *et al.*, 1996). Sin embargo, se han descrito casos en los que los patógenos aprovechan las estrategias defensivas derivadas de la respuesta ETI en su favor. Es el caso de los hongos necrotrofos, capaces de generar ROS gracias a la activación de enzimas hidrolíticas (NADPH oxidasas y peroxidasas), provocando muerte celular en el hospedador y facilitando el acceso del patógeno a los nutrientes, de forma que se facilita el desarrollo de la infección. En el caso específico de *F. oxysporum*, hongo hemibiotrofo, hay cierta controversia en cuanto a si las especies ROS están favoreciendo o impidiendo el desarrollo de la infección. Los trabajos llevados a cabo con mutantes de *A. thaliana* que expresan de forma constitutiva el gen de senescencia *SEN1* y que presentan muerte celular y producción de ROS de forma espontánea, demuestran la mayor susceptibilidad de estos mutantes a una infección por *F. oxysporum* (Schenk *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios con *Asparagus densiflorus* describen la restricción del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* gracias a la muerte celular del tejido de la epidermis radicular y a la activación de peroxidasas (He *et al.*, 2001). De esta forma parece que la producción de ROS y la muerte celular asociada

tienen efectos diferentes en función del tipo de interacción planta-patógeno, e incluso se ha sugerido que podrían existir distintos tipos de muertes celular y/o diferentes especies reactivas de oxígeno que tendrían funciones opuestas en el desarrollo de la enfermedad (Berrocal-Lobo y Molina, 2008). A esto hay que añadir que las especies reactivas de oxígeno tienen funciones no sólo directas sobre la modulación de la infección, sino también indirectas actuando como moduladores en la respuesta defensiva del hospedador junto con otras señales moleculares de la propia planta, como son el ácido salicílico (SA) y el óxido nítrico (NO) (Torres *et al.*, 2006).

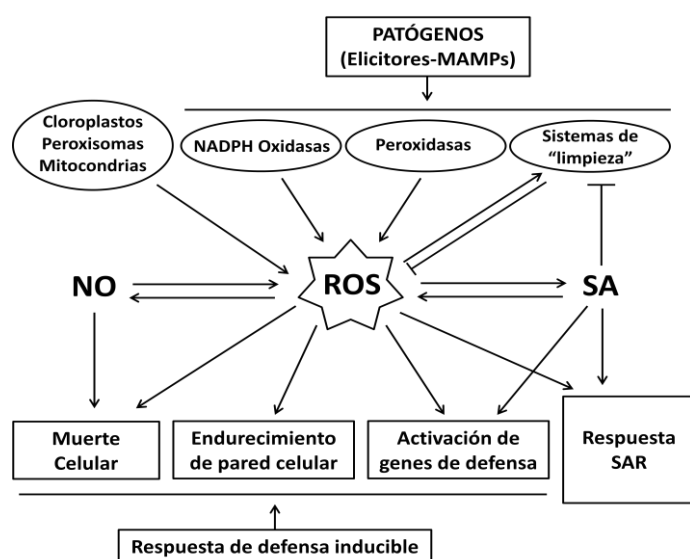


Figura 7. Funciones de las especies reactivas de oxígeno en la respuesta defensiva frente a patógenos (modificado de Torres *et al.*, 2006).

Durante la respuesta de tipo SAR, la planta también libera fitohormonas señalizadoras de un ataque por patógenos, tal es el caso del ácido salicílico, el ácido jasmónico (JA) o el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2012; Thomma *et al.*, 2001). Tradicionalmente se ha descrito la presencia de ácido salicílico en interacciones con patógenos biotróficos y hemibiotróficos, siendo el gen *PR1* el que se utiliza como marcador de las defensas dependientes de esta hormona (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012; Uknes *et al.*, 1992), y la presencia de ácido jasmónico y etileno en interacciones con patógenos necrotróficos, insectos herbívoros y también frente a daños mecánicos, siendo los genes *ERF1* y *PDF1.2* marcadores genéticos implicados en la resistencia desencadenada por esta vía (Glazebrook, 2005; Penninckx *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012). La liberación de estas y otras fitohormonas (citoquininas, auxinas, ácido abscísico, brasinosteroides) por parte

de la planta se ha relacionado con una activación de la expresión de genes codificantes para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, *Pathogenesis Related*) modulando las rutas de señalización del sistema inmune vegetal (Glazebrook, 2005; Maleck *et al.*, 2000; Pieterse *et al.*, 2012; Reymond *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000). En el caso particular de *F. oxysporum* se ha demostrado la inducción de la resistencia sistémica adquirida a través de la acción del ácido salicílico como vía de resistencia frente a este patógeno (Mauch-Mani y Slusarenko, 1994), habiéndose comprobado que plantas tratadas con esta hormona antes de la inoculación con este hongo muestran una reducción en la sintomatología característica de fusarioris (Edgar *et al.*, 2006).

Si bien se considera al ácido salicílico como el principal inductor de la resistencia sistémica adquirida provocando la acumulación de proteínas PR (Durrant y Dong, 2004), hay interacciones tanto cooperativas como antagónicas entre las distintas vías moleculares de defensa mediadas por fitohormonas. En este sentido, numerosos han sido los estudios que han profundizado en la importancia de la vía de señalización mediada por etileno en la defensa frente a patógenos actuando como punto de confluencia de las diferentes vías reguladas por fitohormonas. Esta vía depende de una familia de factores de transcripción conocidos como factores de respuesta a etileno (ERF, *Ethylene Response Factors*) que, en el caso de *A. thaliana* está formada por 122 miembros (Nakano *et al.*, 2006a). El primero en ser descrito, ERF1, que se considera un elemento clave en la integración de las vías de respuesta a etileno y a ácido jasmónico (Lorenzo *et al.*, 2003) actuando como regulador aguas abajo de la intersección entre ambas vías (Lorenzo *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2006b), promueve la expresión del gen *PDF1.2* y del gen *PR3* (codificador de una quitinasa básica (Cheng *et al.*, 2013) con actividad antimicrobiana (Verburg y Huynh, 1991)). Tanto ERF1 como ERF2, que se ha demostrado necesario en la resistencia frente a *F. oxysporum* (McGrath *et al.*, 2005), están regulados por etileno a través de ERF14 (Oñate-Sánchez *et al.*, 2006). Aunque recientemente se han identificado otros miembros de esta familia (ERF5, ERF6 (Moffat *et al.*, 2012), ERF96 (Catinot *et al.*, 2015)) que parecen ser importantes de la defensa frente a necrotrofos, frente a *F. oxysporum* su papel aún no está claramente definido: mientras a unos se les asigna un papel como activadores de la respuesta defensiva (Huang *et al.*, 2015), a otros, como por ejemplo ERF4, se les asigna un papel como

reguladores negativos mediante interacciones antagónicas entre ácido salicílico, ácido jasmónico y ácido abscísico (Yang *et al.*, 2005).

La respuesta defensiva frente a patógenos en general, y frente a *F. oxysporum* en particular, engloba, además de las vías de señalización mediadas por ácido salicílico y por JA/ET, otras vías entre las que se incluye la mediada por ácido abscísico. La interrelación entre todas estas vías determina la activación de los factores necesarios para la resistencia en los hospedadores (Figura 8) (Berrocal-Lobo y Molina, 2008). La resistencia de las plantas a *F. oxysporum* mediada por fitohormonas ha sido estudiada con diferentes mutantes de *A. thaliana* y de *S. lycopersicum* deficientes en las vías de señalización de etileno (mutante *ein2-5*), ácido jasmónico (mutantes *co-1*, *jar1-1*) y ácido salicílico (mutantes *NahG*, *sid2-1*, *eds1-1*, *eds-3*, *eds-4*, *eds-10*), en su interacción con las formas especiales *conglutinans* y *lycopersici*, respectivamente. Los resultados de estos trabajos demuestran que las tres vías moleculares son importantes en el control de la fusariosis en *A. thaliana* existiendo efectos cooperativos similares a los observados en la resistencia de esta especie vegetal frente a *Botrytis cinerea* o *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007). A pesar de la función cooperativa descrita, la expresión constitutiva de algunos genes codificadores para reguladores transcripcionales de estas vías es suficiente por sí sola para conferir una mayor resistencia a *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2004) y a otros patógenos vasculares (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). En este sentido se ha descrito un incremento en la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y a *F. graminearum* en plantas de tomate y trigo, respectivamente, que sobreexpresan el gen *PR1* de *Arabidopsis* (Makandar *et al.*, 2006). En el caso concreto de la interacción *Phaseolus vulgaris* - *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, estudios realizados en nuestro grupo de investigación con estirpes del hongo que presentan diferencias en su grado de virulencia, han demostrado en la interacción con estirpes poco virulentas respecto a la interacción con estirpes muy virulentas una mayor activación de la vía de defensa mediada por ácido salicílico, con un incremento en la expresión de *PR1* en etapas tempranas de la infección, y una supresión de la vía de señalización mediada por JA/ET, con una reducción en la expresión de los genes *ERF1* y *ERF2*. Esto se correlaciona directamente con un patrón de colonización de la planta casi exclusivamente a nivel de parénquima en las interacciones con estirpes poco virulentas, lo que determina que la enfermedad en este caso no progrese con éxito, a

diferencia de lo que ocurre en las interacciones con las estirpes muy virulentas, en las que la colonización de la planta se produce mayoritariamente a nivel vascular permitiendo al hongo avanzar por los tejidos vegetales para así completar su proceso de infección (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

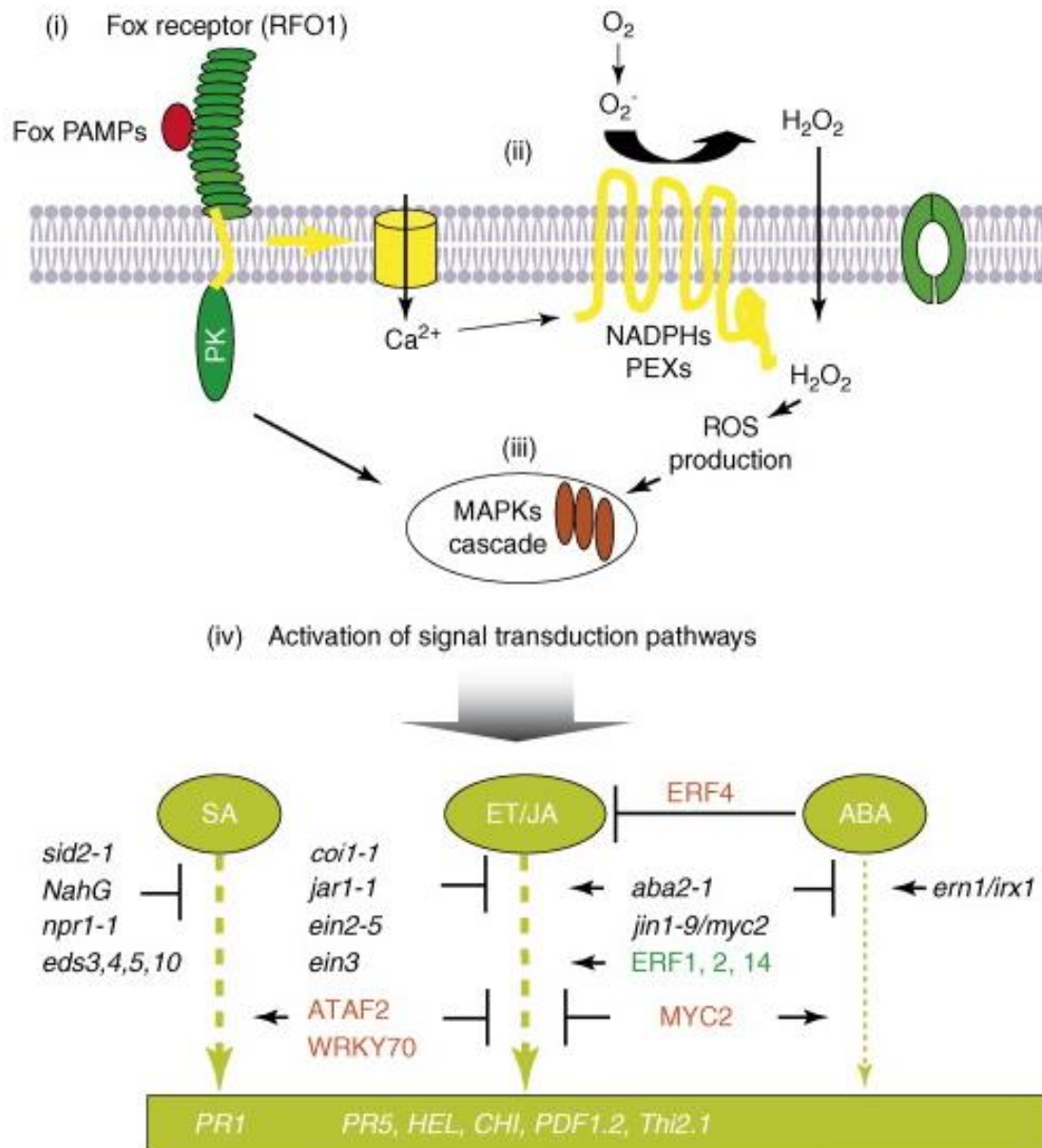


Figura 8. Red de vías de transducción de señales implicadas en la respuesta defensiva de *Arabidopsis thaliana* frente a *Fusarium oxysporum*. Los reguladores positivos ERF1, ERF2 y ERF14 están marcados en verde, los reguladores negativos están marcados en rojo. Las barras en forma de T identifican mutantes de *A. thaliana* con deficiencias de señalización en la resistencia a *F. oxysporum*; las flechas identifican mutantes con una mayor resistencia (tomado de Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

Se puede concluir por tanto, que el reconocimiento del patógeno *F. oxysporum* en particular, y de los microorganismos fitopatógenos en general, por parte de la planta requiere de una serie de mecanismos con una regulación genética compleja y variable, pudiendo estar mediado por elicitores/PAMPs o por efectores/proteínas de avirulencia (Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

Estrategias de los hongos fitopatógenos en la infección: *F. oxysporum* frente a su hospedador

Para evitar ser reconocidos por el huésped o incluso bloquear la respuesta defensiva de éste y poder completar su ciclo de infección, los patógenos han desarrollado una serie de mecanismos generales y/o específicos, entre los que se incluyen los siguientes:

- Producción de enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs).

F. oxysporum es capaz de secretar toda una batería de enzimas de tipo CWDEs (poligalacturonasas PG1, PG5 y PGX4, pectato liasa PL1, xilanasas XYL3, XYL4 y XYL5, proteasas) durante la penetración y colonización de la raíz del hospedador. Se ha descrito la necesidad de una actuación conjunta de las mismas para lograr una infección efectiva, ya que la inactivación funcional de una sola de estas enzimas no afecta a la virulencia (Di Pietro *et al.*, 2003).

- Producción de enzimas degradadoras de toxinas vegetales.

Muchos hospedadores vegetales, en respuesta a un ataque por patógenos, producen compuestos tóxicos para éstos. Los patógenos secretan enzimas capaces de degradar dichos compuestos, lo que les permite continuar con el proceso infectivo. En la interacción *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*–*Solanum lycopersicum* se ha descrito la producción de enzimas tomatinasas (Lairini *et al.*, 1996) que degradan la toxina antifúngica α -tomatina producida por la planta (Roddick, 1977) contribuyendo así a la virulencia del hongo (Pareja-Jaime *et al.*, 2008).

- Producción de micotoxinas y enzimas hidrolíticas.

Bien por la presencia del propio patógeno o bien por la presencia de elicitores derivados de éste, las plantas acumulan compuestos de tipo fenólico en su

pared celular para fortalecerla y oponer resistencia al avance del patógeno (Michielse y Rep, 2009). En el caso de *F. oxysporum*, se ha descrito que el propio patógeno detecta la presencia de dichos compuestos fenólicos e induce la expresión de genes codificadores para enzimas hidrolíticas (pectinasas, celulasas o amilasas) además de incrementar la secreción de micotoxinas, predominantemente ácido fusárico (Wu *et al.*, 2008a; Wu *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2008c). De esta forma, los compuestos fenólicos producidos por la propia planta estarían ejerciendo un doble papel en la interacción con el patógeno: por un lado ayudan en la respuesta defensiva del huésped al impedir el crecimiento fúngico y, por tanto, el avance de la enfermedad; mientras que por otro lado estarían promoviendo el desarrollo de la propia infección al inducir la producción de micotoxinas e incrementar el nivel de la actividad de enzimas hidrolíticas (Michielse y Rep, 2009). Para evitar esta acción negativa de los compuestos fenólicos sobre los patógenos, éstos los degradan a través de dos rutas metabólicas: bien por la vía del β -cetoadipato, o bien mediante enzimas de tipo lacasa. Los mutantes inactivados en el gen *CMLE1*, codificador para una enzima de la vía del β -cetoadipato, muestran una reducción en su crecimiento cuando se cultivan en medios suplementados con compuestos fenólicos, lo que indica que al menos esta vía es necesaria para un crecimiento normal del hongo, probablemente también para la patogenicidad (Michielse y Rep, 2009; Michielse *et al.*, 2009b). Las enzimas de tipo lacasa son fenol-oxidasas con átomos de cobre en su centro catalítico. En *F. oxysporum* se han descrito seis genes codificantes para enzimas lacasas, tres de ellos (*LCC1*, *LCC3* y *LCC9*) se encuentran inducidos durante el proceso de infección. Si bien las lacasas *LCC1*, *LCC3* y *LCC5* no son imprescindibles de forma individual para la patogenicidad, se ha descrito que una reducción global de la actividad lacasa provocada por la inactivación del canal de cloruro *CLC1* en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* conlleva un retraso en el desarrollo de la fusariosis en tomate (Cañero y Roncero, 2008b).

- Modificación de la pared celular.

Se ha demostrado que los patógenos modifican su pared celular durante la infección para resistir el daño derivado de las enzimas o compuestos vegetales producidos y/o para reducir la liberación de elicitores derivados de la propia pared celular fúngica. Como se mencionó anteriormente, los genes que codifican para

enzimas de tipo quitina sintasa (*CSH*) son importantes en la patogenicidad ayudando a reforzar la pared celular fúngica, además de estar involucradas en la resistencia a compuestos antifúngicos como el peróxido de hidrógeno o la toxina α -tomatina (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008): los mutantes de *F. oxysporum* inactivados en *CHS2*, *CHS7* y *CHSVb* muestran una reducción de virulencia sobre plantas de tomate al ser más susceptibles a agentes degradadores de pared celular producidos por la planta.

- Protección externa de las hifas.

Para proteger las hifas y esporas del ambiente altamente húmedo existente en los tejidos del hospedador, los hongos se recubren de una capa hidrofóbica que dificulta el reconocimiento del hongo por el sistema inmune de la planta. Se ha descrito que mutantes deficientes en el gen que codifica para la MAPK FMK1, componente de la ruta de señalización MAPK-PKA implicada en el reconocimiento de la planta por parte del hongo (Di Pietro *et al.*, 2001), incapaces de penetrar y colonizar la raíz de plantas de tomate, presentan una elevada humectabilidad en la superficie de las hifas, lo que sugiere una reducción en la expresión de genes codificantes para hidrofobinas (Di Pietro *et al.*, 2003). Las hidrofobinas son proteínas de pequeño tamaño (≤ 20 kDa) con capacidad para formar espontáneamente monocapas anfipáticas en interfaces hidrofóbico-hidrofílicas. Esta monocapa de hidrofobinas reduce la tensión superficial del medio o sustrato en el que crece el hongo permitiéndole romper la interfaz aire-agua o prevenir el anegamiento sin perder permeabilidad para el intercambio gaseoso, además de mediar la adhesión del hongo a superficies hidrofóbicas en las interacciones con la planta (Bayry *et al.*, 2012). Así, se ha descrito que las hidrofobinas MPG1 y MHP1 de *M. grisea*, si bien utilizan mecanismos diferentes, son fundamentales para la formación de apresorios y, por tanto, para la patogenicidad del hongo sobre plantas de arroz (Kim *et al.*, 2005; Talbot *et al.*, 1993; Talbot *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.- Conocer la influencia de la concentración de la fuente de carbono presente en el medio sobre la capacidad de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* para modular el pH del medio que le rodea, a través del análisis de cambios físico-químicos en el medio de cultivo de crecimiento para el hongo y a través del análisis de expresión génica de genes presuntamente regulados por el factor de transcripción PacC.

2.- Identificar las vías metabólicas en las que participa el factor de transcripción FTF2 como regulador mediante la consecución y posterior caracterización fisiológica de estirpes con interrupción génica en el gen *FTF2* en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Organismos

Bacterias

Escherichia coli

Se utilizó la cepa DH5 α [F-, Φ 80 *dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYAargF*)U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r_K-*, *m_K+*), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gryA96*, *relA1*, λ -] en los experimentos de transformación bacteriana por choque térmico y en la clonación de plásmidos.

Agrobacterium tumefaciens

Se utilizó la cepa AGL-1 [AGL0, *recA::bla*, pTiBo542 (Δ)T Mop+ CbR] (Lazo *et al.*, 1991) para las transformaciones de *Fusarium oxysporum* mediante el uso de vectores binarios necesarios para este tipo de transformaciones.

Hongos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Las estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizadas en el presente trabajo se muestran en la Tabla 5.

ESTIRPE	GENOTIPO	PATOGENICIDAD/ VIRULENCIA	VCG	RAZA	ORIGEN
FOP-SP1	<i>Silvestre</i>	HV	167	6	La Carrera (CIALE)
FOP-SP4	<i>Silvestre</i>	WV	166	6	La Carrera (CIALE)
FOP-SP13	<i>Silvestre</i>	SV	169	6	Villafranca (CIALE)
AB82	<i>Silvestre</i>	NP	167	6	El Barco de Ávila (CIALE)
FOP-SP1 Δ FTF2	Δ FTF2				FOP-SP1 (Este trabajo)
FOP-SP4 Δ FTF2	Δ FTF2				FOP-SP4 (Este trabajo)
FOP-SP4Ect	-				FOP-SP4 (Este trabajo)

Tabla 5. Estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizadas en el trabajo. HV, muy virulento (*Highly Virulent*); WV, poco virulento (*Weakly Virulent*); SV, supervirulento (*Super-Virulent*); NP, no patógeno (*Non-Pathogenic*); VCG, grupo de compatibilidad vegetativa (*Vegetative Compatibility Group*).

Plantas: *Phaseolus vulgaris* L. (Judía)

Para los ensayos de infección se utilizaron semillas de la variedad Blanca Riñón cultivada en la región de El Barco de Ávila-Piedrahíta (Ávila, España).

2.- Medios y condiciones de cultivo

Para bacterias

Escherichia coli

Las condiciones y medios de cultivo utilizados fueron los descritos por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). La temperatura óptima de incubación fue siempre de 37°C, tanto en medios sólidos como líquidos; en este último caso los cultivos se incubaron en oscuridad y con una agitación de 250 r.p.m. en un orbital Künher 1SF-1-W.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Medio LB (Luria-Bertani): utilizado para los experimentos de transformación, clonación y obtención de ADN plasmídico. El medio está compuesto por extracto de levadura (Difco) 0,5 %; bacto triptona (Difco) 1 %; NaCl 1%. Cuando el medio requerido era sólido se añadió agar bacteriológico (Conda) al 1,5%.
- Medio Circlegrow® líquido (Fisher Scientific): este medio se utilizó para obtener ADN plasmídico en grandes cantidades. Para su preparación se disuelven 40 g en 1 L de agua destilada.

Para la selección de colonias resistentes a antibióticos, éstos se añadieron al medio ya esterilizado: kanamicina a una concentración de 50 µg/µL; ampicilina a una concentración de 100 µg/µL.

Agrobacterium tumefaciens

La temperatura óptima de crecimiento fue siempre de 28°C. En el caso de cultivos líquidos, la incubación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y agitación de 250 r.p.m. en un orbital Künher 1SF-1-W. Para su crecimiento se utilizó el medio LB (líquido o sólido en función del objetivo del experimento) suplementado con los

antibióticos de selección correspondientes en los casos que fue necesario, en las mismas concentraciones usadas para el crecimiento de *E. coli*.

Otros medios y condiciones de cultivo utilizados para *A. tumefaciens* se detallan en el apartado 16 de Materiales y Métodos (Transformaciones).

Conservación a largo plazo

Todas las cepas bacterianas se conservaron en crioviales a -80°C en glicerol estéril al 25% (V/V).

Para hongos: *Fusarium oxysporum*

Las condiciones y los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las distintas estirpes de *F. oxysporum* variaron en función del tipo de experimento realizado.

En medio líquido

- Germinación abundante de esporas: crecimiento durante 3-5 días en un incubador orbital Kühner 1SF-1-W a 25°C con agitación de 180 r.p.m. e iluminación constante. Los medios utilizados fueron PDB y medio de esporulación (se detallan en la Tabla 6).
- Crecimiento de micelio: incubación en un incubador orbital a 25°C, agitación de 120 r.p.m. e iluminación constante. Los medios utilizados y el tiempo de incubación dependieron del experimento a realizar (PDB, medio mínimo, medio de esporulación, medio M3S) (se detallan en la Tabla 6).

En medio sólido

- Germinación de esporas y obtención de cultivos monoconídicos: los cultivos procedentes de microconidios uninucleados se obtuvieron a partir de una dilución de esporas depositada en placa de Petri con medio agar-agua, que fue incubada durante 10-12 horas a 25°C en una cámara de germinación con iluminación constante. Pasado este tiempo se observaron los microconidios uninucleados y germinados en una lupa binocular Olympus SZX12 y se recogieron con ayuda de un punzón estéril de forma individual en una pequeña porción de agar. Se transfirieron finalmente a una placa estéril con medio

sólido PDA suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Las placas con los microconidios se incubaron a 25°C hasta que el micelio ocupó la placa por completo.

- Obtención de micelio: se utilizaron placas de Petri con medios de crecimiento que variaron en función del experimento, y que fueron incubadas en una cámara de germinación a 25°C durante el tiempo y con el fotoperíodo requeridos para cada ensayo en particular.

Conservación a largo plazo

Para todas las estirpes se guardaron, por duplicado, suspensiones de micelio y conidios en crioviales a -80°C en glicerol al 25% (V/V).

MEDIO	COMPOSICIÓN (por litro de agua destilada)
Agar-agua	20 g agar bacteriológico
PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i> , Difco)	39 g
PDB (<i>Potato Dextrose Broth</i> , Difco)	24 g
Medio de esporulación (Hadas <i>et al.</i> , 2007)	60 g sacarosa; 7 g NaNO ₃ ; 3 g triptona; 1 g KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,5 g KCl; pH 7
Medio M3S (Tu, 1985)	2,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 2,7 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g peptona; 1 g extracto de levadura; 10 g sacarosa
Medio basal ** (Correll <i>et al.</i> , 1987)	1 g KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,5 g KCl; 10 mg FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0,2 mL elementos traza; 20 g agar bacteriológico
Medio mínimo suplementado con fuente de carbono y fuente de nitrógeno ***	Medio basal; fuente de carbono; fuente de nitrógeno

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo utilizados en el crecimiento de *F. oxysporum*.

****ELEMENTOS TRAZA** (en 95 mL de agua destilada): 5 g ácido cítrico; 5 g ZnSO₄·7H₂O; 1 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O; 0,25 g CuSO₄·5H₂O; 50 mg MnSO₄·H₂O; 50 mg H₃BO₄; 50 mg NaMoO₄·2H₂O.

*****FUENTES DE NITRÓGENO**: se utilizaron diferentes fuentes de nitrógeno en las siguientes concentraciones: NaNO₃ 23,5 mM; NaNO₂ 7,25 mM; tartrato de amonio 5,43 mM (Correll *et al.*, 1987); NH₄NO₃ 12,49 mM (Di Pietro y Roncero, 1996).

FUENTES DE CARBONO: se utilizaron diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, glicerol, xilosa, manosa) en dos concentraciones: 3% (Correll *et al.*, 1987) y 0,3% (m/V).

Para plantas: Judía (*Phaseolus vulgaris* L.)

Germinación de semillas

Para su germinación, las semillas de judía fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5% (V/V) durante 5 minutos; ésta fue eliminada por completo mediante sucesivos lavados con agua destilada estéril. Inmediatamente después, se sembraron en bandejas que contenían vermiculita estéril (Projar, SA), un sustrato inerte que favorece la retención de la humedad garantizando una germinación óptima de las semillas. Las bandejas con las semillas se incubaron a 25°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 7-10 días. Tras este tiempo las plántulas fueron retiradas de la vermiculita e inoculadas con las estirpes de *F. oxysporum* de interés y trasplantadas a los diferentes medios descritos a continuación en este apartado.

Crecimiento en invernadero

Para los ensayos de infección en invernadero, las plántulas inoculadas con las estirpes del hongo se replantaron en macetas de 0,6 L que contenían como sustrato una mezcla estéril de tierra-vermiculita en relación 3:1. Las judías se cultivaron en el invernadero, preferentemente en el período comprendido entre marzo y octubre, con las siguientes condiciones controladas:

Temperatura: media de 25°C.

Humedad relativa: 60 – 70 %.

Fotoperíodo: ajustado al menos a 12 horas de luz cuando las condiciones ambientales externas al invernadero fueron desfavorables.

Las plantas fueron regadas de forma regular con agua corriente.

Crecimiento en cámara de germinación

En los ensayos de infección en medio hidropónico, las plántulas inoculadas con el hongo de interés se colocaron en tubos de 50 mL que contenían como sustrato el medio líquido PGM (*Plant Growth Media*) (*), que se añadió de forma regular durante el ensayo para mantener el sistema radicular siempre sumergido en el medio. Los

tubos se mantuvieron cerrados con *Parafilm*[®] y forrados con papel de aluminio durante todo el ensayo. Las plantas se cultivaron en cámaras de germinación con condiciones controladas:

Temperatura: 25°C.

Humedad relativa: 75%.

Fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

***PGM** (*Plant Growth Media* (Yedidia *et al.*, 1999)) (en 1 L de agua destilada): 0,24 g MgSO₄; 0,04 g K₂HPO₄; 0,17 g K₂SO₄; 0,344 g CaSO₄·H₂O; 0,64 g NH₄NO₃; 1 mL elementos traza.

Solución de elementos traza (1 L de agua destilada): 0,375 g ZnSO₄·7H₂O; 0,125 g CuSO₄·5H₂O; 0,846 g MnSO₄·H₂O; 1,546 g H₃BO₃; 0,05 g FeCl₃; 0,728 g KCl; 0,081 g H₂MoO₄; 0,001 g CoCl₂·6H₂O; pH 7.

3.- Ensayos de germinación

Para determinar la tasa de germinación de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, se inocularon éstos en medio de esporulación (descrito en la Tabla 6) y se incubaron a 25°C y 180 r.p.m. durante 3-4 días. Tras la incubación indicada se recuperaron las esporas, en su mayoría microconidios, del medio de cultivo filtrando éste a través de una doble gasa estéril. Las esporas se sedimentaron centrifugando 5 minutos a 2.600 x g y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril dos veces centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente se llevó a cabo el recuento de esporas en una cámara de citometría *Thoma* al microscopio.

Se preparó una suspensión de esporas en agua, o en el medio de interés, a una concentración de 10⁶ esporas/mL, y se depositó una gota de 100 µL en el centro de una placa de Petri de 45 mm de diámetro. Las placas se mantuvieron en una caja de plástico transparente cerrada en cuyo fondo se colocó un papel absorbente humedecido para mantener la humedad relativa. Se incubaron todas las placas en cámaras de germinación a 25°C en condiciones de iluminación permanente.

Se estimó la germinación de los distintos aislados a través de recuentos de esporas en la gota depositada en la placa a intervalos de tiempo de 2 horas durante un tiempo total de 10 horas. Para ello se transfirió la gota con las esporas a un tubo de 1,5 mL en el que se sedimentaron éstas por centrifugación a máxima velocidad durante 5

minutos, quedando concentradas en un volumen pequeño tras eliminar el 90% del sobrenadante. Se depositó la muestra en un portaobjetos y se tomaron fotografías de 4-5 campos diferentes al microscopio óptico utilizando el objetivo 20X (microscopio óptico Leica DLMB (Leica Microsystems), con cámara Leica DC300F adaptada) y con la ayuda del programa ACDSee v3.1b (ACD Systems); en esas fotografías se contabilizaron las esporas germinadas y no germinadas determinándose así el porcentaje de esporas germinadas. Se consideró germinada aquella espora cuyo tubo germinativo tenía una longitud al menos igual que la mitad de la longitud de la espora no germinada.

4.- Ensayos de esporulación

La producción de esporas por parte de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se determinó cultivando éstos en medio PDB. En primer lugar se inocularon los aislados en medio PDB y se incubaron a 25°C y 180 r.p.m. durante 8-10 días. Pasado este tiempo de incubación, se recuperaron y contabilizaron las esporas como se describió en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se utilizaron estas esporas limpias y frescas para inocular 25.000 esporas/mL en 40 mL de medio de cultivo PDB en matraces de 125 mL; los cultivos se inocularon a 25°C y 180 r.p.m. con iluminación constante. En todos los casos se utilizaron cuatro cultivos para cada estirpe teniendo así cuatro valores del número de esporas para cada aislado en cada tiempo evaluado.

El número de esporas producido se evaluó a los 3, 5, 7 y 10 días después de la inoculación. Para ello se tomaron, en condiciones de esterilidad, 2 mL del cultivo que se filtraron a través de una gasa estéril para eliminar posibles restos de micelio evitando interferencias en el recuento, y finalmente se contaron las esporas en una cámara de citometría *Thoma* al microscopio utilizando las diluciones necesarias para hacer un recuento más preciso.

5.- Ensayos de crecimiento saprofítico

Las estirpes conservadas en stocks de glicerol a -80°C se cultivaron en placas de PDA a 25°C durante 5 días. Partiendo de las colonias, se tomaron inóculos de 2 x 2 mm y se colocaron en el centro de placas de Petri que contenían los medios de interés

(detallados en el apartado 2 de Materiales y Métodos), inoculándose tres placas para cada condición y estirpe. Se incubaron las placas durante 6 días en cámaras de incubación a 25°C y con los requerimientos de luz indicados para cada experimento concreto. Se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de cada colonia cada 24 horas; el valor de la media de ambas medidas se consideró como dato final del crecimiento de la estirpe para cada tiempo.

6.- Ensayos de infección en planta y cuantificación de síntomas

Ensayos en invernadero

La capacidad patogénica y el grado de virulencia de los distintos mutantes de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* obtenidos en el presente trabajo se analizaron mediante ensayos de infección sobre plantas de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) que se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Pastor-Corrales y Abawi (Pastor-Corrales y Abawi, 1987).

Por un lado se inocularon 50 mL de medio de esporulación con la estirpe de interés en cada caso y se permitió el crecimiento a 25°C y 180 r.p.m. durante 3-4 días. Se recuperaron las esporas del medio de cultivo el mismo día en que se llevó a cabo la infección siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Con las esporas limpias se preparó una suspensión en agua a una concentración de 10^6 esporas/mL en un volumen final suficiente en el que sumergir el sistema radicular de las plántulas a inocular.

Por otra parte se tomaron las plántulas de judía germinadas en vermiculita (según se describió en el apartado 2 de Materiales y Métodos) cuando presentaban al menos dos tercios de desarrollo de las hojas cotiledónicas (7 a 10 días tras la siembra). Las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar restos de vermiculita y se simulon lesiones radiculares cortando los ápices radiculares con una tijera previamente desinfectada.

Inmediatamente después de crear las lesiones radiculares, se sumergieron las raíces de las plántulas durante 5 minutos en la suspensión de esporas previamente

preparada. Pasado este tiempo las plantas fueron retiradas de la suspensión de esporas y replantadas en macetas tal y como se describió en el apartado 2 de Materiales y Métodos.

Las judías se cultivaron en el invernadero en las condiciones detalladas en el apartado 2 de Materiales y Métodos, y se regaron con agua corriente de forma regular durante todo el ensayo.

Cuantificación de síntomas

Se evaluó la sintomatología producida por *Fusarium* en las plantas mediante cuatro aproximaciones: escala CIAT, masa de la parte aérea de la planta, longitud internodal y manchas en los haces vasculares (índice de enfermedad).

○ Escala CIAT.

Siguiendo las indicaciones de Pastor-Corrales y Abawi (Pastor-Corrales y Abawi, 1987), se determinó el porcentaje de hojas de la planta con síntomas de fusariosis (clorosis, amarilleamiento, marchitez y/o caída prematura), asignando a cada porcentaje un valor entre 1 y 9 según se indica en la Tabla 7.

Índice de Escala CIAT	% de hojas sintomáticas
1	0% Planta sana
2	0-5 %
3	5-15 %
4	15-25 %
5	25-35 %
6	35-50 %
7	50-75 %
8	75-100%
9	100 % o planta muerta

Tabla 7. Escala CIAT. Modificado de Alves-Santos *et al.*, 1999; Pastor-Corrales y Abawi, 1987.

Se evaluó la incidencia de la enfermedad con esta aproximación una vez por semana durante un total de cuatro o cinco semanas, considerándose las plantas como:

- ▣ Resistentes: plantas con un índice entre 1 y 3.
- ▣ Susceptibles: plantas con un índice superior a 3.

Además, utilizando esta escala se estableció una clasificación de las estirpes de *Fusarium* según su virulencia sobre la variedad de judía Blanca Riñón siguiendo el criterio establecido por Alves-Santos y colaboradores (Alves-Santos *et al.*, 2002):

- ▣ Estirpes no patógenas: no provocan lesiones en la judía, las plantas son resistentes a la enfermedad tras cinco semanas de infección.
- ▣ Estirpes patógenas poco virulentas: provocan susceptibilidad en las plantas, pero éstas no mueren al término del ensayo. No se supera el índice 8 en la escala CIAT.
- ▣ Estirpes patógenas muy virulentas: provocan lesiones en las judías en fases muy tempranas de la infección. Al final del ensayo se supera el índice 8 en la escala CIAT y las plantas están muertas.

A partir de los datos de escala CIAT se determinó el índice DPR (*Disease Progression Rate*) con la siguiente fórmula matemática:

DPR = $\sum_i X_i/n$, siendo X_i la severidad de la enfermedad según la escala CIAT (de 1 a 9) y n el número de semanas tras la infección (García-Sánchez *et al.*, 2010).

- Masa de la parte aérea de la planta.

Después de la evaluación de la sintomatología en las plantas para calcular el índice CIAT pasadas cuatro semanas desde la inoculación, se cortaron las judías con una tijera por el hipocotilo a nivel de la tierra y se determinó la masa de todos los tejidos aéreos en una balanza.

- Longitud internodal.

Pasadas cuatro semanas tras la inoculación de las estirpes fúngicas, se determinó la longitud internodal midiendo la longitud del entrenudo de la planta localizado entre las hojas cotiledónicas y las primeras hojas verdaderas.

- Manchas en haces vasculares (Índice de enfermedad).

Al término del ensayo de infección tras evaluar la sintomatología de las plantas y determinar la masa de las partes aéreas de la planta, se observó macroscópicamente la presencia de manchas necróticas en el hipocotilo en un corte transversal del mismo. Así se asignó un valor numérico comprendido entre 0 y 4 en función del número de manchas observadas: 0, sin manchas; 1, uno o dos haces vasculares marrones; 2, más de tres haces vasculares de color marrón; 3, anillo marrón en el hipocotilo al estar todos los haces vasculares de este color; y 4, planta muerta o hipocotilo seco (Niño-Sánchez, 2016).

Ensayos en medio hidropónico en cámara de germinación

Cuando se necesitó tejido vegetal infectado a tiempos cortos (1 a 21 días después de la inoculación) y las condiciones climatológicas impidieron un desarrollo óptimo de la planta en el invernadero (temperaturas extremas, altas o bajas), se llevaron a cabo ensayos de infección en medio hidropónico.

Las esporas se obtuvieron de la misma forma que se ha descrito para los ensayos de infección en invernadero, y las judías se germinaron tal y como se detalló en el apartado 2 de Materiales y Métodos. La inoculación con las estirpes de *Fusarium* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe inmediatamente anterior. Las plántulas inoculadas se colocaron en tubos de 50 mL que contenían medio PGM como sustrato, tal y como se indicó en el apartado 2 de Materiales y Métodos, y se mantuvieron en cámara de germinación en las condiciones indicadas en ese mismo apartado. Se verificó durante todo el ensayo que las raíces estuvieran completamente sumergidas en PGM y se rellenó en caso necesario.

7.- Medida de la concentración de amonio

La concentración de amonio en cultivos líquidos de hongo se determinó con un test colorimétrico de la casa comercial Merck (*Ammonium test*), siguiendo las indicaciones del fabricante con ciertas modificaciones.

Por centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos se eliminaron los restos celulares y tisulares de la muestra, mezclando después en vórtex 500 μ L de ésta con 4,5 mL de agua destilada y 600 μ L del reactivo $\text{NH}_4\text{-1}$. Posteriormente se añadieron

los reactivos NH₄-2 y NH₄-3 según las indicaciones del kit. Se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 690 nm en un espectrofotómetro. Como muestra blanco se utilizaron 5 mL de agua destilada y como muestra de referencia se utilizaron 500 µL del medio utilizado en cada experimento que se mezclaron con 4,5 mL de agua destilada, en ambos casos se procedió tal y como se ha descrito para las muestras a analizar.

Los valores de concentración de amonio se determinaron con la siguiente fórmula matemática:

Concentración de amonio (mM) = $[(A_m - A_r) * 1,58] / 18$, donde A_m es el valor de absorbancia de la muestra problema y A_r es el valor de absorbancia de la muestra de referencia.

8.- Medida de la concentración de ácido glucónico

Se utilizó el test *D-Gluconic acid / D-Glucono-δ-lactone UV-method* de la casa comercial r-biopharm (Roche) para determinar la concentración de ácido glucónico presente en los cultivos líquidos de hongo. El test determina, por absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, la concentración de NADPH producido después de las reacciones que convierten el ácido glucónico en ribulosa-5-fosfato y CO₂. La cantidad de NADPH es equimolecular a la de ácido glucónico inicial, de modo que la determinación del primero es un indicativo de la concentración del segundo en la muestra.

Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas para espectrofotómetro (cubetas de metacrilato de 1,5 mL) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron previamente a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar restos celulares y evitar que interfiriesen en la reacción.

La concentración de ácido glucónico presente en las muestras se calculó utilizando la siguiente fórmula matemática:

Concentración de ácido glucónico, GLA (g/L) = $(5,961 / 6,3) * 4 * (A_m - A_b)$, donde A_m es el valor de absorbancia de la muestra problema y A_b es el valor de absorbancia de la muestra que actúa como blanco.

9.- Análisis microscópicos

Todos los análisis microscópicos se realizaron sobre muestras de plantas inoculadas con los aislados de interés de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* que se mantuvieron en cultivo hidropónico tal y como se detalló en el apartado 7 de Materiales y Métodos. En los tiempos indicados a continuación, se realizaron cortes manuales con una cuchilla de afeitar para obtener secciones transversales o longitudinales de 1 mm de grosor de los tejidos vegetales de interés.

Tinción WGA-FITC/yoduro de propidio

La aglutinina de germen de trigo WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) es una lectina con capacidad de unión a residuos de N-acetilglucosamina presentes en la quitina de la pared celular de hongos. Basándose en esta capacidad, se han diseñado compuestos conjugados con esta aglutinina que emiten fluorescencia verde brillante al ser excitados con una longitud de onda apropiada. En este trabajo se utilizó el conjugado WGA Alexa Fluor® 488 (ThermoFisher Scientific) cuyo nivel máximo de excitación/emisión está en $\lambda=495/519$ nm. Se aprovechó esta capacidad de estas moléculas para hacer un seguimiento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante la infección de plantas de *P. vulgaris*, tomando para ello muestras del sistema radicular a 1, 2 y 3 dpi, del cuello de raíz a 5 y 7 dpi, y del hipocotilo a 14 y 21 dpi.

Se siguió el procedimiento descrito por Poppe y colaboradores (Poppe *et al.*, 2015) con algunas modificaciones para adaptarlo a nuestro sistema de trabajo. Las secciones de la planta infectada, obtenidas como se detalló anteriormente, se sumergieron inmediatamente en etanol 100% (V/V) y se mantuvieron a 4°C durante un tiempo variable entre 16 y 24 horas. En este período se realizaron varios lavados con etanol 100% (V/V). Tras este tiempo, se sustituyó el etanol por una solución acuosa de KOH al 10% (m/V) y se incubaron las secciones sumergidas en ella a 85°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se lavaron con PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino) 1X (*) cuatro veces, y finalmente se añadió 1mL de la solución de tinción (*) (las secciones quedaron en todo momento sumergidas en la solución de tinción). Se permitió la infiltración del colorante en el tejido vegetal mediante pulsos de vacío en un equipo de vacío Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (ThermoFisher

Scientific); se dieron al menos 10 pulsos de 2 minutos cada uno agitando la solución colorante entre cada uno de ellos. Tras la infiltración, se eliminaron los restos de solución colorante con un lavado en PBS 1X, conservando las secciones sumergidas en éste durante 16 horas a 4°C. Finalmente las secciones se colocaron en un portaobjetos sumergidas en glicerol 30% (V/V) para su visualización al microscopio.

***PBS 1X** (en 1 L de agua destilada): 8,06 g NaCl; 0,22 g KCl; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,20 g KH₂PO₄; pH 7,4.

Solución de tinción (preparada en PBS 1X): 10 µg/mL WGA-FITC; 20 µg/mL yoduro de propidio; 0,02% (V/V) *Tween 20*.

El análisis microscópico se llevó a cabo usando un microscopio confocal de barrido láser espectral (TC S2-SP2, Leica Microsystems). La excitación fue proporcionada por un láser de argón (488 nm). La fluorescencia del conjugado WGA Alexa Fluor® 488 se detectó en el espectro comprendido entre 490 y 540 nm, mientras que la autofluorescencia de la pared celular vegetal junto con la tinción de yoduro de propidio se detectaron en el espectro comprendido entre 570 y 640 nm.

El procesamiento posterior de las imágenes se realizó con la ayuda de los programas Leica Application Suite (Leica Microsystems), LAS-Advanced Fluorescence Lite 1.8.2 (Leica Microsystems) e ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

10.- Obtención de ácidos nucleicos

ADN genómico de hongo y planta

ADN genómico de *Fusarium*

- Método CTAB.

El método de aislamiento de ADN genómico utilizando bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue descrito por Murray y Thompson (Murray y Thompson, 1980) y publicado posteriormente por Wagner (Wagner *et al.*, 1987). Este procedimiento permite extraer y purificar ADN de muestras fúngicas eliminando polisacáridos y compuestos polifenólicos de las mismas. En este trabajo se siguió este protocolo con ciertas modificaciones descritas a continuación.

Para todas las extracciones se partió de tejido homogeneizado completamente por uno de estos dos métodos:

- ▣ Homogeneización en nitrógeno líquido: se utilizó con micelio de hongo recogido por filtración del medio de cultivo a través de una doble gasa estéril o de un papel de filtro estéril. Se pulverizaron muestras de entre 200 y 400 mg en un mortero con nitrógeno líquido y se recogieron posteriormente en tubos de 1,5 mL. Se conservaron a -80°C hasta su uso.
- ▣ Homogeneización tras liofilización: únicamente usada con muestras de hongo muy numerosas. Se recogió micelio desde el medio de cultivo y se transfirió con la ayuda de unas pinzas estériles a un tubo de 1,5 mL cuyo tapón se había perforado con un punzón para permitir que se produjese el vacío en el interior del tubo. Las muestras se colocaron en un liofilizador (Virtis advantage) conectado a una bomba de vacío (Savant ValuPump VLP120) durante 6–8 horas. Tras este tiempo se pulverizó el micelio liofilizado con la ayuda de unas varillas de vidrio estériles, e inmediatamente después se procedió con la extracción del ADN.

Independientemente del método para obtener la muestra homogeneizada, al tubo que contenía ésta se añadieron 800 μL de la solución de extracción DEB (*) y la mezcla se incubó a 65°C durante 1 hora con agitación manual por inversión cada 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 15 minutos a $12.000 \times g$ y 4°C tras mezclarlo manualmente mediante inversiones continuas. Se recogió la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1,5 mL nuevo al que se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo para eliminar el ARN añadiendo 1 μL de ARNasa 10 mg/mL (Roche) e incubando la muestra a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo 750 μL de la mezcla isopropanol: acetato amónico 7,5 M (4:1) y manteniendo la muestra a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó en una microfuga *ependorf* de poyata a máxima velocidad ($16.000 \times g$) durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se verificó la existencia de precipitado que se lavó al menos dos veces con 1 mL de etanol 70% (V/V)

centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos. Finalmente el ADN limpio se resuspendió en 50-100 µL de agua Milli-Q estéril, se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 0,6 % (m/V) tal y como se detalla más adelante en este mismo apartado. El ADN se conservó a 4°C.

***Solución de extracción DEB (1:1:0,4):** tampón de lisis nuclear (200 mL Tris 1 M pH 7,5; 100 mL EDTA 0,5 M pH 8; 20 g CTAB, ajustando hasta 1 L con agua destilada); tampón de aislamiento de ADN (63,78 g sorbitol; 12,1 g Tris Base/THAM; 1,68 g EDTA, ajustando a pH 7,5 y hasta 1 L con agua destilada); N-laurilsarcosina 5% (m/V).

- Método Pac-Bio.

El procedimiento utilizado para aislar ADN genómico destinado a la secuenciación del genoma de estirpes fúngicas se basó en las recomendaciones descritas por la plataforma *Pacific Biosciences Sequencing* (www.pacb.com). El método recomendado permite extraer y purificar ADN de elevado peso molecular de muestras tanto vegetales como fúngicas, conservando la calidad y la integridad de las moléculas de ácido nucleico.

Para obtener las muestras de micelio a partir del cual se aisló el ADN genómico, se inocularon esporas de las estirpes fúngicas de interés en medio mínimo suplementado con NaNO₃ 23,5 mM como fuente de nitrógeno y sacarosa al 3% (m/V) como fuente de carbono (Tabla 6). Se permitió el crecimiento del hongo durante 4 días a 25°C con agitación a 120 r.p.m., período tras el cual se recogió el micelio por filtración en vacío del medio de cultivo a través de un papel de filtro estéril, y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido.

Todas las extracciones se llevaron a cabo a partir de micelio homogeneizado completamente en nitrógeno líquido tal y como se detalló en el epígrafe inmediatamente anterior de este apartado. Se utilizaron 500 mg de micelio homogeneizado para la extracción del ADN genómico según el procedimiento descrito a continuación.

Se prepararon 875 µL de solución de extracción ABC (*) en el momento inmediatamente anterior a la extracción, solución que se calentó a 64°C durante 5 minutos, dejándola enfriar hasta temperatura ambiente (22-25°C) posteriormente durante 5 minutos más. Pasado este tiempo se añadieron 20 µL de ARNasa 10 mg/mL

a la solución de extracción e inmediatamente se transfirió la mezcla al tubo que contenía la muestra homogeneizada. Se mezcló vigorosamente la muestra hasta obtener una suspensión homogénea que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente mezclando por inversión cada 5 minutos. Pasado este tiempo de incubación, se añadieron 10 μ L de Proteinasa K 20 mg/mL y se incubó durante 30 minutos más en las mismas condiciones mezclando también por inversión cada 5 minutos. Transcurrida esta incubación la muestra se colocó en hielo durante 5 minutos, para añadir posteriormente a la mezcla 0,2 volúmenes de acetato de potasio 5 M pH 7,5, manteniendo la muestra 5 minutos más en hielo. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 12 minutos a 5.000 x g y 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL nuevo al que se añadió 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando por inversión durante 2 minutos; posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 x g y 4°C. Se recogió la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1,5 mL nuevo al que se añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 mL para eliminar restos de ARN añadiendo 10 μ L de ARNasa 10 mg/mL e incubando la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se mezcló por inversión y se añadió 1 volumen de isopropanol, se mezcló de nuevo por inversión y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 4°C y 10.000 x g durante 30 minutos, eliminando el sobrenadante con la ayuda de una pipeta automática. Se lavó el precipitado dos veces con 1 mL de etanol 70% (V/V) centrifugando a 13.000 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta automática y se dejó secar el precipitado durante 7 minutos manteniendo el tubo abierto. Finalmente el ADN limpio se resuspendió en 20 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Pasado este tiempo se añadieron 20 μ L más de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, y se mantuvo la suspensión a temperatura ambiente 16 horas más. Pasado este tiempo se añadieron 10 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y se agitó la mezcla a 1.400 r.p.m. y 28°C durante 60 minutos.

La concentración del ADN obtenido se determinó mediante fluorimetría en un Qubit[®] 3.0 (Invitrogen) y la calidad se estimó mediante cuantificación en un Nanodrop

ND-1000 (Thermo Scientific). La integridad se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,6% (m/V) utilizando como referencia el patrón de masa comercial High DNA Mass Ladder (Invitrogen). El ADN se conservó a 4°C.

***Solución de extracción ABC (2,5:2,5:1):** tampón A (0,35 M sorbitol; 0,1 M Tris-HCl pH 9; 5 mM EDTA pH 8); tampón B (0,2 M Tris-HCl pH 9; 50 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl; CTAB 2% (m/V)); tampón C (N-laurilsarcosina 5% (m/V)).

ADN genómico de *Phaseolus vulgaris* L. Método CTAB para judía

Afanador y colaboradores (Afanador *et al.*, 1993) introdujeron modificaciones en el método de aislamiento de ADN genómico que utiliza bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) (Wagner *et al.*, 1987) para utilizarlo en muestras de tejido vegetal de judía común y eliminar el exceso de polisacáridos arrastrados hasta el final de la extracción con el método estándar. Para todas las extracciones de muestras vegetales de este trabajo, se utilizó tejido completamente homogeneizado en nitrógeno líquido obtenido tal y como se describió anteriormente en este mismo apartado de Materiales y Métodos.

Al tubo que contenía la muestra homogeneizada se añadieron 100 µL de tampón de extracción (*) precalentado a 65°C, y se mezcló vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente se añadieron 300 µL más de tampón de extracción también precalentado a 65°C. La mezcla se incubó a 65°C durante 20 minutos con agitación a 800 r.p.m. Tras este tiempo de incubación se añadió 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente (22-25°C). Posteriormente se centrifugó a 4°C y 15.700 x g durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa que fue transferida a un tubo de 1,5 mL nuevo y a la que se añadió 1 volumen de isopropanol previamente enfriado. Se mezcló por inversión y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación se centrifugó a 4°C y 15.700 x g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado y seco se resuspendió en 100 µL de agua Milli-Q estéril, para eliminar a continuación restos de ARN añadiendo 4 µL de ARNasa 10 mg/mL e incubando la muestra a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado y manteniendo la muestra a -20°C durante 30

minutos. Se centrifugó la muestra a 4°C y a máxima velocidad (16.000 x g) durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se verificó la existencia de precipitado que se lavó al menos dos veces con 1 mL de etanol 70% (V/V) centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos. Finalmente el ADN limpio se resuspendió en 25 µL de agua Milli-Q estéril, se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 0,6 % (m/V). El ADN se conservó a 4°C.

***Tampón de extracción:** CTAB 2% (m/V); 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; β-mercaptoetanol 1% (V/V).

ADN plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Lisis alcalina

El protocolo utilizado es una modificación del manual del kit comercial Plasmid Mini-Preps Using Wizard Kit (Promega). Aunque con este procedimiento no se obtuvo ADN de alta pureza, se consiguieron cantidades suficientes para ser utilizado en reacciones de PCR y digestiones enzimáticas posteriores. Se recurrió a este método de extracción de forma rutinaria para la comprobación de posibles colonias bacterianas transformadas.

Se inoculó la colonia de interés en 3 mL de medio LB (Luria-Bertani) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente en los casos en los que fue necesario, se incubó durante 16 horas a la temperatura de crecimiento óptima para la bacteria (37°C para *E. coli* y 28°C para *A. tumefaciens*). Tras la incubación se centrifugó el cultivo bacteriano a 3.000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en 250 µL de Solución de Resuspensión (*) con una agitación vigorosa en vórtex, transfiriendo después la mezcla a un tubo de 1,5 mL. A la suspensión de células se añadieron 250 µL de Solución de Lisis (*) y se mezcló por inversión varias veces, incubando a temperatura ambiente (22-25°C) durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 250 µL de Solución de Neutralización (*), se mezcló todo por inversión varias veces y se eliminaron los restos celulares lisados por centrifugación a máxima velocidad (16.000 x g) durante 10 minutos. Tras este tiempo se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL nuevo al que se añadieron 800 µL de isopropanol frío para precipitar el ADN. Se centrifugó de

nuevo en las mismas condiciones. Finalmente se descartó el sobrenadante, el ADN plasmídico limpio y seco se resuspendió en 50 µL de agua Milli-Q estéril. El ADN se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 0,6% (m/V) tal y como se describe en el apartado 14 de Materiales y Métodos, conservándolo a -20°C hasta su utilización.

***Solución de Resuspensión:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; ARNasa A 100 µg/mL.

Solución de Lisis: 0,2 M NaOH; 1% SDS (m/V).

Solución de Neutralización: 1,32 M acetato de potasio; pH 4,8.

Purificación de plásmidos a través de columnas comerciales

En los experimentos que requirieron un alto grado de pureza del ADN (construcción de plásmidos o reacciones de secuenciación), se utilizó el kit de minicolumnas comerciales NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante partiendo de cultivos bacterianos de 2 a 4 mL.

Cuando se necesitó además de un alto grado de pureza, una gran cantidad de ADN (por ejemplo en la purificación de plásmidos de bajo número de copia que se utilizaron como vectores de clonación) se utilizó el kit de columnas comerciales NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) partiendo de cultivos de 100 mL y siguiendo las recomendaciones marcadas por el fabricante.

ARN total

Extracción con el método del TRIzol®

Este método se utilizó para obtener ARN de muestras fúngicas. El micelio se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido tal y como se describió para la obtención de ADN genómico fúngico en este mismo apartado de Materiales y Métodos. Se llevó a cabo la extracción según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones para incrementar el rendimiento y la pureza en las condiciones utilizadas en el presente trabajo, siempre manteniendo las muestras a 4°C con el fin de evitar la degradación del ARN.

Al tubo que contenía el micelio homogeneizado se añadió 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) y se agitó en un vórtex hasta conseguir una mezcla homogénea, para

centrifugar inmediatamente después a 12.000 x g y 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló agitando vigorosamente en el vórtex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente (22-25°C) durante 3 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 12.000 x g y 4°C durante 15 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1,5 mL nuevo al que se añadieron 250 µL de isopropanol y el mismo volumen de solución de precipitación (*). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 12.000 x g y 4°C durante 10 minutos. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaron dos veces con etanol 75% (V/V) diluido con agua Milli-Q estéril tratada con DEPC 1% (V/V), centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos las dos veces. Por último, se añadieron al precipitado 50 µL de agua Milli-Q DEPC 1% (V/V) estéril y se incubó a 60°C durante 10 minutos para resuspender éste.

Los restos de ADN genómico presentes en la muestra se eliminaron mediante un tratamiento con ADNasa del kit comercial Turbo DNA-free™ (Ambion, Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

***Solución de precipitación:** 0,8 M citrato sódico; 1,2 M NaCl.

Extracción con el kit comercial SV Total RNA Isolation System Z3105 (Promega)

Este método de extracción de ARN se utilizó de forma preferencial cuando la muestra procedía de una interacción hongo-planta. En todos los casos se utilizaron muestras de 30 mg de tejido homogeneizado y se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante.

El ARN extraído por cualquiera de los dos métodos se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1% (m/V), como se describe en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La pureza y concentración de ADN y ARN se estimaron midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). La relación A_{260}/A_{280} es un indicativo de la pureza del ácido nucleico de interés respecto a las proteínas y tiene un valor de 1,8 para el genoma de *E. coli* y 2,0 para el ARN total, valores que pueden presentar ligeras variaciones en función del contenido G-C del genoma del organismo de interés. La estimación dada por el espectrofotómetro se verificó analizando alícuotas de las muestras de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 14 de Materiales y Métodos) al 0,6 % (m/V) para ADN y 1% (m/V) para ARN, utilizando marcadores de peso molecular a concentraciones conocidas para estimar el tamaño y concentración de las muestras de interés.

11.- Vectores de clonación

pGEM[®]-T-Easy (Promega)

Este vector se utilizó en la clonación de amplicones de PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se comercializa de forma lineal para poder ser usado sin necesidad de reacciones previas. El plásmido tiene un tamaño de 3.015 pb y posee en ambos extremos una desoxitimidina 3' terminal lo que mejora la eficiencia de clonación de los amplicones de interés, debido a que las polimerasas termoestables habituales añaden con frecuencia una desoxiadenosina única en los extremos 3' de los amplicones de PCR. El vector dispone del origen de replicación del bacteriófago filamentoso f1.

Los marcadores de selección por fenotipo del vector son el gen de resistencia al antibiótico ampicilina y la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*). La inactivación insercional del péptido permite la identificación fenotípica por color de las colonias bacterianas recombinantes (en *E. coli* las colonias son blancas si el inserto se ha clonado en el vector y son azules en caso contrario) al añadir al medio de cultivo sólido LB el sustrato y el inductor de la enzima, X-gal e IPTG, respectivamente.

La secuencia del amplicón clonado se puede determinar mediante las secuencias para el reconocimiento de los cebadores *universal* y *reverso* localizadas en ambos flancos de la multidiana de restricción.

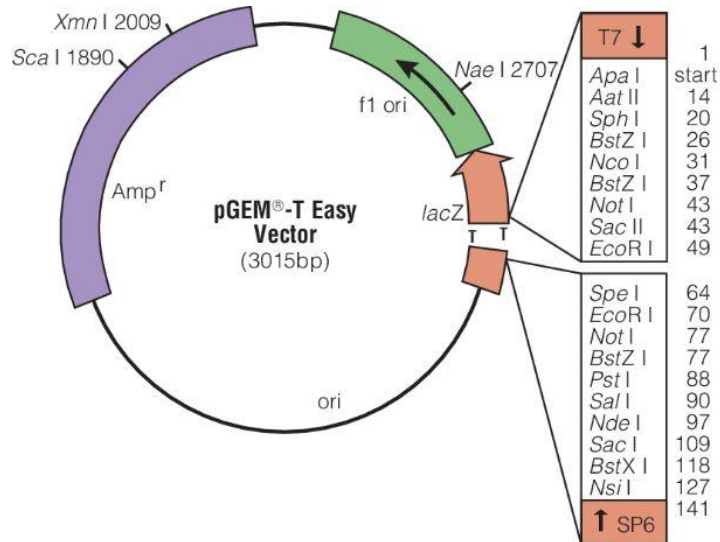


Figura 9. Mapa circular del vector de clonación pGEM®-T-Easy.

pRF-HU2 (Frandsen *et al.*, 2008)

El vector pRF-HU2 fue diseñado por Frandsen y colaboradores (Universidad de Copenhague) para ser utilizado en las clonaciones basadas en la estrategia USER (*Uracil-Specific Excision Reagent*) *Friendly*[™] (New England Biolabs) (apartado 13 de Materiales y Métodos). Es un vector binario, contiene las regiones de reconocimiento para la inserción conocidas como *Left Border* (LB) y *Right Border* (RB), y posee el origen de replicación de *E. coli* oriV. Tiene como marcador de selección bacteriano el gen de resistencia al antibiótico kanamicina y como marcador seleccionable para hongos, el gen de la higromicina B fosfotransferasa (*hph*) que confiere resistencia a higromicina.

Este plásmido tiene un tamaño de 6.323 pb y posee dos sitios de clonación, UCS (RB) y UCS (LB), ubicados uno en cada extremo del cassette de resistencia a higromicina. Los sitios de clonación de los amplicones de PCR de interés poseen la secuencia de restricción para la enzima *PacI* flanqueada por las secuencias para la enzima *Nt.BbvCI*. La secuencia de los extremos sobresalientes que quedan tras la digestión combinada con las dos enzimas marca la especificidad en la clonación que siempre es direccional.

El vector pRF-HU2 se utilizó para la clonación de dos amplicones de PCR en un paso único en los experimentos de reemplazamiento génico. Se siguieron las indicaciones del grupo de Frandsen (Frandsen *et al.*, 2008).

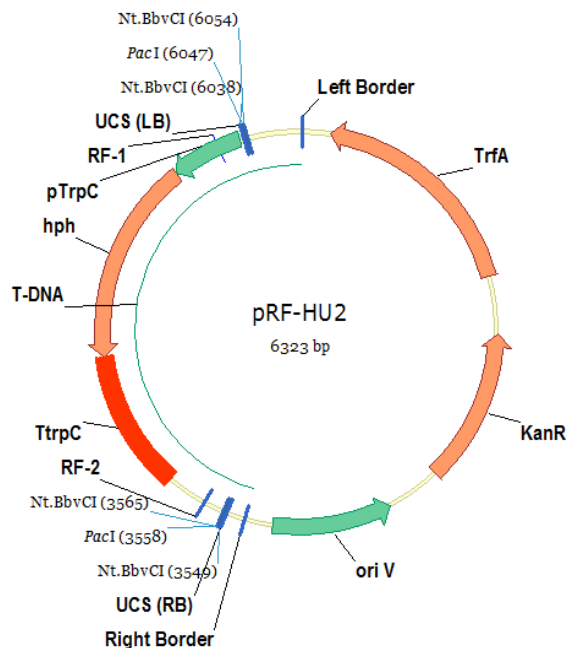


Figura 10. Mapa circular del vector de clonación pRF-HU2.

12.- Manipulación de ácidos nucleicos

Tratamiento con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo de forma rutinaria para la construcción de nuevos vectores recombinantes y la caracterización física de éstos y de otro tipo de fragmentos de ADN.

Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial de la enzima utilizada en cada caso en particular (Takara, Roche, New England Biolabs). En todos los casos las digestiones se realizaron en presencia del tampón salino más óptimo a una concentración final 1X, a una temperatura de incubación generalmente de 37°C y durante un tiempo variable entre 2 y 16 horas en función de la cantidad y pureza del ADN utilizado en la reacción.

Las reacciones de digestión realizadas con la enzima USER™ (New England Biolabs) se llevaron a cabo de manera específica a 37°C durante 30 minutos para mellar los amplicones generados por PCR.

Defosforilación con fosfatasa alcalina

Para la defosforilación de fragmentos de ADN se utilizó la fosfatasa alcalina FastAP *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Scientific) que actúa en las mismas condiciones independientemente del tipo de extremos generados por las enzimas de restricción.

El ADN, digerido con las endonucleasas de interés y purificado con el kit de minicolumnas NucleoSpin® Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), fue tratado con la fosfatasa (1 unidad por cada μg de ADN) en una reacción a la que se añadió tampón a una concentración final 1X y agua destilada estéril para alcanzar un volumen final de 20 μL . La reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se inactivó la enzima mediante una incubación a 75°C durante 5 minutos. Finalmente la mezcla se purificó utilizando el mismo kit comercial que se usó para purificar el ADN digerido, y se utilizó en reacciones de ligación posteriores.

Ligaciones

Las ligaciones de fragmentos de ADN a vectores de clonación se llevaron a cabo en las condiciones más óptimas para cada uno de los vectores utilizados en el trabajo.

Clonación USER™ *Friendly*

La estrategia de clonación USER™ (*Uracil-Specific Excision Reagent*) *Friendly* (New England Biolabs) permite llevar a cabo clonaciones direccionales de amplicones de PCR sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción ni ADN ligasas para fusionar dichos amplicones a un vector. El sistema requiere que los cebadores diseñados para la amplificación del inserto de interés posean en sus extremos 5' una secuencia específica de nueve pares de bases en la que se incluye un único nucleósido 2-deoxi-uridina.

La técnica de clonación se basa en las dos actividades que presenta la enzima USER™: por un lado su actividad uracil-ADN glicosilasa escinde el nucleótido de uridina de los extremos del inserto amplificado mediante PCR, lo que genera una cadena mellada de nueve nucleótidos en los extremos 3' del amplicón; por otro lado su

actividad endoglicosilasa-liasa VIII rompe la unión de los 8 nucleótidos restantes de la cadena mellada con la cadena íntegra. De esta forma se obtiene un amplicón cuyos extremos tienen una secuencia única de nueve pares de bases.

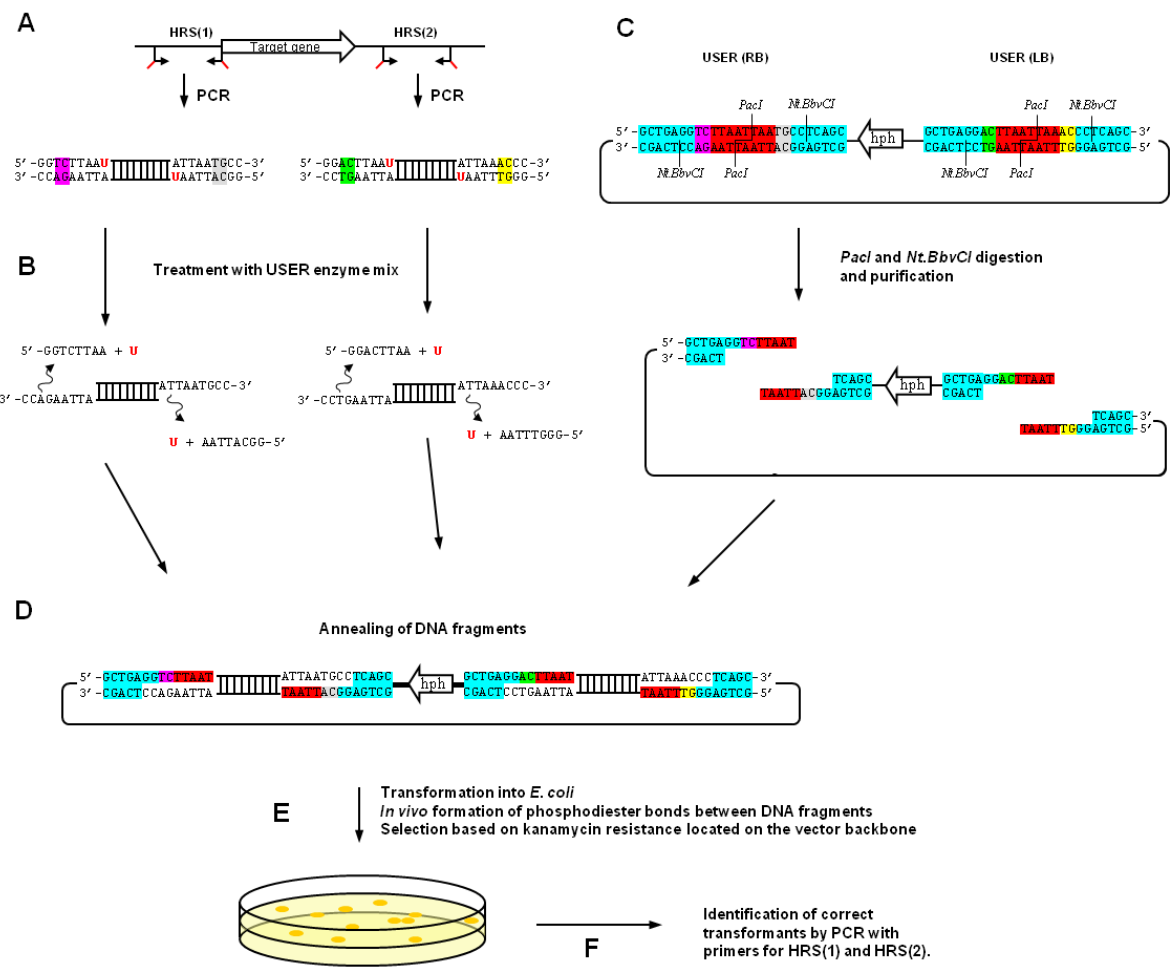


Figura 11. Estrategia de clonación USER™ Friendly para la obtención de un vector de reemplazamiento génico en un único paso (tomado de Frandsen *et al.*, 2008).

Este sistema de clonación se utilizó para clonar amplicones de ADN en el vector pRF-HU2. En primer lugar se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar los insertos de interés utilizando como cebadores los oligonucleótidos en cuyos extremos 5' se había incluido la secuencia de nueve pares de bases específica para cada caso, según describe el grupo de Frandsen (Frandsen *et al.*, 2008). Por otro lado, el vector de interés se digirió con las enzimas *PacI* y *Nt.Bbv.CI* que dejan, en sus secuencias de restricción, extremos sobresalientes y complementarios a la secuencia de nueve pares de bases añadida a los extremos 5' de los oligonucleótidos con los que se generaron los insertos a clonar. Tanto amplicón como vector digerido se purificaron con el kit que se indicó en el epígrafe anterior de este apartado de Materiales y Métodos, y se

incorporaron, siguiendo las recomendaciones de Frandsen y colaboradores (Frandsen *et al.*, 2008), en una reacción de ligación a la que también se añadieron tampón de PCR a una concentración 1X y enzima USER™ (1 unidad). La mezcla se incubó en un termociclador durante 30 minutos a 37°C seguidos de otros 30 minutos a 25°C.

La reacción de ligación generó una molécula estable que se introdujo inmediatamente después mediante transformación por choque térmico en células competentes de *E. coli* (apartado 16 de Materiales y Métodos). La transformación permite la unión definitiva de los fragmentos de ADN ligados a través una ligación *in vivo* que es catalizada por los sistemas de reparación de ADN de la propia bacteria.

Ligación con ADN ligasa T4

La enzima ADN ligasa T4 cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre terminaciones yuxtapuestas de grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo en moléculas de ADN de doble cadena con extremos tanto romos como cohesivos. Para su actividad la enzima requiere ATP como cofactor, suministrado por la casa comercial (Roche) junto con el tampón 10X (660 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; ATP; pH 7,5).

Todas las ligaciones se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante en el mínimo volumen de reacción posible, generalmente entre 5 y 10 µL, con las diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1 µL de ligasa a una concentración de 1 U/µL. Las reacciones se incubaron a 16°C durante 12-20 horas. Tras este tiempo, el producto de ligación se utilizó en experimentos de transformación bacteriana por choque térmico sobre células DH5α de *E. coli* (apartado 16 de Materiales y Métodos).

13.- Electroforesis

Electroforesis lineal de ADN

Las electroforesis lineales de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa preparados, según las necesidades de cada experimento, en porcentajes entre 0,6 y 3% (m/V) en tampón TAE 1X (*). Se utilizaron cubetas horizontales de 15 y 30 cm de largo en las que los geles se sumergieron en tampón de electroforesis TAE 1X.

Las muestras de ADN se mezclaron, en proporción 5:1, con tampón de carga (*), de forma que el ADN entraba correctamente en los pocillos y se podía seguir el avance de la electroforesis por la posición relativa de los colorantes del tampón de carga.

Se cargaron las muestras preparadas en el gel de agarosa incluyendo una muestra en un carril con un patrón comercial de marcadores de tamaños conocidos (1 Kb Plus *DNA Ladder*, Invitrogen; 1 kb *DNA ladder*, Biotools), y posteriormente se aplicó un voltaje variable entre 6 y 10 V/cm en función del rango de tamaños a resolver y la cantidad de ADN.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 15 minutos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) preparada con tampón TAE 1X y se lavaron posteriormente con agua destilada durante 10 minutos. El ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta ($\lambda=260$ nm) y se capturaron las imágenes con el equipo de visualización AlphaImager MINI (Protein Simple).

***TAE 1X:** 40 mM Tris Base; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA pH 8.

Tampón de carga: 0,1% azul de bromofenol (m/V); 0,1% xilén cianol FF (m/V); 30% glicerol (V/V).

Electroforesis de ARN

Las electroforesis de ARN se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), las recomendaciones de la casa comercial Roche Molecular Biochemicals (manual para el marcaje de sondas con digoxigenina (DIG)) y las indicaciones de la casa comercial Promega (manual para el análisis de ARN).

Se utilizaron cubetas horizontales de 15 y 30 cm de largo en las que los geles se sumergieron en tampón de electroforesis MOPS 1X (*). Los geles de agarosa se prepararon a un porcentaje del 1% (m/V) en tampón de electroforesis MOPS 1X, añadiendo 2% (V/V) de formaldehído una vez fundida y enfriada la agarosa hasta 55°C.

Previamente a la carga en el gel de las muestras, 1 µg de ARN se mezcló con 2 volúmenes de tampón para muestras de ARN (*) y la mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C para permitir la desnaturalización del ARN. Inmediatamente después se colocaron las muestras en hielo durante 2 minutos, y pasado este tiempo se

añadieron 2 μL de tampón de carga (*) para poder cargarlas en el gel y seguir el avance de la electroforesis. Se aplicó un voltaje de 4-5 V/cm durante aproximadamente 2 horas, manteniendo la cubeta de electroforesis dentro de una campana de extracción para evitar las emanaciones tóxicas derivadas del formaldehído.

Debido a la baja conductividad eléctrica del tampón de electroforesis MOPS 1X, para asegurar una distribución uniforme del mismo dentro de la cubeta de electroforesis, cada 10-15 minutos se transfirió tampón desde el ánodo hasta el cátodo de ésta y viceversa con ayuda de una pipeta.

Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 5 minutos en una solución de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preparada con agua destilada tratada con DEPC; se lavaron posteriormente, durante al menos 3 horas, con agua destilada tratada con DEPC. Se comprobó la cantidad y calidad del ARN migrado mediante la exposición de los geles a luz ultravioleta ($\lambda=260\text{ nm}$) en un transiluminador, tomando las imágenes correspondientes en el equipo de adquisición de imágenes detallado anteriormente en este apartado (electroforesis de ADN).

***MOPS 1X:** 40 mM MOPS; 10 mM acetato de sodio; 1 mM EDTA; pH 7.

Tampón para muestras de ARN: 1 mL formamida desionizada; 350 μL formaldehído 37%; 200 μL tampón MOPS 5X.

Tampón de carga: 50% glicerol (V/V); 1 mM EDTA; 0,4% azul de bromofenol (m/V).

Todos los tampones y soluciones fueron preparados en agua tratada con DEPC para evitar la degradación del ARN.

14.- Recuperación de fragmentos de ADN desde gel

La recuperación de fragmentos de ADN migrados en gel de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Se siguieron las recomendaciones indicadas por el manual del fabricante.

Con el fin de incrementar el rendimiento de la purificación, se consideraron ciertos aspectos previos en la electroforesis: se utilizó un bajo porcentaje de agarosa (0,6 - 0,7% (m/V), según el tamaño del fragmento que se deseó recuperar), se aplicó un bajo voltaje y alta resolución para diferenciar de forma clara y precisa el fragmento de interés. Finalizada la electroforesis, con la ayuda de una hoja de bisturí estéril, se

cortó el fragmento de agarosa donde se localizaba el ADN. Inmediatamente después se procedió a la purificación del ADN del bloque de agarosa utilizando el kit ya mencionado.

15.- Transformaciones

Transformaciones bacterianas

Transformación de *Escherichia coli* mediante choque térmico

- Preparación de células competentes.

Las transformaciones se llevaron a cabo con células competentes conservadas a -80°C que fueron preparadas según el método descrito por Hanahan y colaboradores (Hanahan *et al.*, 1995). Para ello se inoculó, a modo de preinóculo, una colonia de la estirpe DH5 α de *E. coli* en 20 mL de medio LB y se incubó durante 16 horas a 37°C y 300 r.p.m. Tras este tiempo se inocularon 5 mL del preinóculo en 500 mL de medio Ψ (Psi) (*) y se incubó a 37°C y 300 r.p.m. hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,48 a $\lambda=550$ nm. Se sedimentaron las células mediante centrifugación a $960 \times g$ y 4°C durante 10 minutos. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron completamente en 150 mL de la solución TFB1 (*) fría mediante agitación manual suave, manteniéndolas en hielo en todo momento. Posteriormente se incubaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 4°C y $1.000 \times g$ durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 mL de solución TFB2 fría (*), manteniéndolas después en hielo durante 15 minutos. Finalmente se repartieron en alícuotas de 100 μL que se conservaron a -80°C .

***Medio Ψ (Psi)** (en 1 L de agua destilada): 20 g de triptona; 5g de extracto de levadura; 0,745 g de MgSO_4 ; pH 7,6 ajustado con KOH 10N.

Solución TBF1 (en 1 L de agua destilada): 12,092 g RbCl_2 ; 6,28 g MnCl_2 ; 2,94 g acetato potásico; 1,09 g CaCl_2 ; 15% glicerol (V/V); pH 5,8 ajustado con ácido acético 0,2 M. Esterilización por filtración.

Solución TBF2 (en 1 L de agua destilada): 2,093 g MOPS; 1,209 g RbCl_2 ; 8,32 g CaCl_2 ; 15% glicerol (V/V); pH 7 ajustado con NaOH 10N. Esterilización por filtración.

- Procedimiento.

Para las transformaciones se utilizaron 50 μL de células competentes que fueron descongeladas en hielo y a las que se añadieron entre 10 y 200 ng de ADN (siempre en un volumen inferior a 20 μL). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos y posteriormente se sometió a un choque térmico de 45 segundos a 42°C seguidos de una incubación de 2 minutos en hielo. Se añadieron 450 μL de medio LB y la mezcla se incubó durante 90 minutos a 37°C y 300 r.p.m., tiempo suficiente para permitir que las bacterias transformadas sintetizaran las proteínas responsables de su selección como lo son las que confieren resistencia a antibióticos. Transcurrido este tiempo se inocularon las células en medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron a 37°C durante 16 horas. En este medio se pudo observar el crecimiento de bacterias transformadas en forma de colonias individuales diferenciadas.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación

- Preparación de células competentes.

Para la obtención de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* se inoculó una colonia de la estirpe AGL-1 en 100 mL de medio LB suplementado con los antibióticos rifampicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El cultivo se incubó durante 16 horas a 30°C con una agitación vigorosa de 200 r.p.m. Tras la incubación, se sedimentaron las células por centrifugación a 3.800 x g y 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 mL de glicerol 10 % (V/V) previamente enfriado hasta 4°C. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se repitió el lavado con glicerol 10% (V/V) frío 2 veces más. Finalmente el sedimento celular se resuspendió en 1 mL de glicerol 10 % (V/V) enfriado hasta 4°C y se repartió en alícuotas de 40 μL que se conservaron a -80°C.

○ Procedimiento.

Para las transformaciones se utilizó un electroporador Bio-Rad gene-pulser™.

Las transformaciones se llevaron a cabo con alícuotas de 40 µL de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, a las que se añadieron entre 50 y 200 ng de ADN (en un volumen nunca superior a 4 µL). La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación estéril previamente enfriada y se sometió a un pulso de 8-12 ms, 2.500 V, 25 µF y 400 Ω. Se recuperó la mezcla de la cubeta añadiendo 1 mL de LB y transfiriéndola a un tubo de 1,5 mL estéril. Las células se incubaron a 28°C y 250 r.p.m. durante 3 horas, tiempo suficiente para permitir que las bacterias se encontraran metabólicamente activas y sintetizaran las proteínas responsables de la resistencia a los antibióticos que permiten su selección posterior. Tras esta incubación, las células se inocularon en medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (en este trabajo kanamicina a una concentración de 50 µg/mL) y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Pasado este período de incubación, en el medio selectivo se pudo observar el crecimiento de bacterias transformadas en forma de colonias individuales diferenciadas.

Transformaciones fúngicas: Transformación de *Fusarium oxysporum* mediada por *A. tumefaciens* (ATMT)

Se siguió el método descrito por Mullins y colaboradores (Mullins *et al.*, 2001) con algunas modificaciones (Ramos *et al.*, 2007). Todos los medios utilizados en la transformación se detallan al final de este epígrafe (Tabla 8).

Una colonia de *A. tumefaciens* portadora del vector binario de interés se inoculó en 2 mL de Medio Mínimo (MM) suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubó en oscuridad a 28°C y 200 r.p.m. durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica del cultivo a $\lambda=600$ nm, y con este dato se ajustó la densidad óptica inicial del siguiente cultivo de la bacteria en Medio de Inducción (MI). Se inoculó la cantidad necesaria de cultivo bacteriano en 2 mL de Medio de Inducción para alcanzar una densidad óptica de 0,15 (nunca se añadió un volumen de inóculo superior al 10% (V/V)), y se incubó en las mismas condiciones de temperatura y

agitación anteriores durante 6 horas. Pasado este tiempo se ajustó de nuevo la densidad óptica a 0,15 añadiendo la cantidad necesaria de Medio de Inducción.

De forma paralela al crecimiento de *A. tumefaciens*, se preparó una suspensión en Medio de Inducción de esporas frescas de la estirpe de *F. oxysporum* que se deseaba transformar a una concentración de 10^6 esporas/mL.

Se mezclaron 100 μ L de la suspensión de esporas con 100 μ L del cultivo bacteriano y la mezcla se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa estéril (0,45 μ m de diámetro de poro) colocada en el centro de una placa de Petri que contenía Medio de Cocultivo (Medio de Inducción con agar bacteriológico al 2% (m/V)) suplementado con kanamicina (50 μ g/mL). Se incubaron las mezclas de hongo y bacteria en oscuridad durante 48 horas a 25°C. Transcurrido este tiempo de incubación, se cortaron las membranas con un hoja de bisturí estéril en cuatro porciones iguales que fueron transferidas a una nueva placa con medio selectivo (en este trabajo PDA suplementado con higromicina B (75 μ g/mL) para seleccionar las colonias de *F. oxysporum* transformadas, y con cefotaxima 200 μ M para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*). Se incubaron las membranas en medio selectivo durante 5-7 días a 25°C. Las colonias resultantes de *F. oxysporum* se transfirieron de manera individualizada a placas nuevas que contenían el mismo medio selectivo, para posteriormente obtener a partir de cada una de ellas cultivos monoconídicos.

	MEDIO MÍNIMO (MM) Para 100 mL	MEDIO DE INDUCCIÓN (MI) Para 100 mL
(*)Tampón K	1 mL	1 mL
(*)Tampón M-N	2 mL	2 mL
CaCl ₂ 1% (m/V)	0,1 mL	0,1 mL
NH ₄ NO ₃ 20% (m/V)	0,25 mL	0,25 mL
Glucosa 2 M	1 mL	0,5 mL
FeSO ₄ 0,01% (m/V)	1 mL	1 mL
(*)Elementos traza	0,5 mL	0,5 mL
Kanamicina 50 mg/mL	0,1 mL	0,1 mL
(*)Acetosiringona 0,2 M		0,1 mL
MES 1 M		4 mL
Glicerol 50% (V/V)		1 mL
Agua estéril	94,15 mL	89,45 mL

Tabla 8. Composición de los medios utilizados durante la transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens*. En rojo se indican los elementos que se añaden después de esterilizar el medio.

*Tampón K (en 1 L de agua destilada): 200 g K₂HPO₄; 145 g KH₂PO₄; pH 7.

Tampón M-N (en 1 L de agua destilada): 30 g MgSO₄·7H₂O; 15 g NaCl.

Solución de elementos traza (en 1 L de agua destilada): 100 mg ZnSO₄·7H₂O; 100 mg CuSO₄·5H₂O; 100 mg H₃BO₃; 100mg MnSO₄·H₂O; 100 mg Na₂MoO₄·2H₂O.

Acetosiringona 0,2 M: 39,24 mg de acetosiringona en 1 mL de etanol absoluto.

16.- Reacciones en cadena de la polimerasa

Reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) fue desarrollada por Saiki y colaboradores (Saiki *et al.*, 1988). Esta técnica permite amplificar fragmentos específicos de ADN a partir un ADN molde mediante un procedimiento cíclico en el que se genera un número elevado de copias idénticas de esos fragmentos.

Todos los ensayos de PCR convencional se llevaron a cabo en tubos de 0,2 mL estériles. El volumen final de la reacción varió entre 25 y 100 µL en función del objetivo

de cada experimento. En todos los casos los componentes de la reacción convencional fueron los siguientes:

- ADN molde.

Es el ADN utilizado como plantilla para generar múltiples copias, habitualmente ADN genómico de un único organismo o estirpe. Se añadieron como norma general 5 ng/ μ L cuando la procedencia del ADN fue fúngica o vegetal, y 0,5 ng/ μ L cuando se utilizó ADN plasmídico.

Las colonias bacterianas obtenidas en las transformaciones se sometieron a un análisis preliminar utilizando para ello ADN molde sin purificación previa: con la punta de un palillo estéril, se tomó parte de una colonia aislada crecida en medio de cultivo sólido, se sumergió posteriormente la punta del palillo en 10 μ L de agua Milli-Q estéril, y se utilizó 1 μ L de la suspensión bacteriana como ADN molde en la reacción de PCR.

- Cebadores.

Como cebadores se utilizaron oligonucleótidos, generalmente de entre 20 y 25 pb, que delimitan el fragmento de ADN que se deseaba amplificar. Se añadieron a la reacción a una concentración final de 0,2 μ M.

Los cebadores fueron diseñados con la ayuda de los programas VectorNTI Advance™ 9 (Invitrogen) y Geneious 8.0.5 (Biomatters), tomando como referencia la secuencia de los genomas anotados y depositados en las bases de datos correspondientes para cada organismo (apartado 21 de Materiales y Métodos). El criterio más destacado a tener en cuenta durante el diseño fue el de la especificidad de los cebadores, que se basó en el valor de temperatura de anillamiento de los mismos, para lo que se tuvieron en cuenta dos parámetros: longitud del oligonucleótido y porcentaje en el contenido de G-C. Como norma general se diseñaron cebadores con una temperatura de anillamiento próxima a 60°C, evitando la formación de bucles internos o dímeros intracatenarios o con otros cebadores.

Los fragmentos de ADN utilizados en la construcción de plásmidos se amplificaron con cebadores en cuyos extremos 5' se añadió una secuencia que permitía el reconocimiento por las enzimas de restricción utilizadas para cada clonación en particular.

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron suministrados por la casa comercial IDT (*Integrated DNA Technologies Inc.*, E.E.U.U.) y se encuentran detallados en la Tabla 10 (Apéndice I).

- dNTPs.

Son los nucleótidos que utiliza la ADN polimerasa para la formación *de novo* del amplicón de interés. Se utilizaron los dNTPs de la casa comercial Biotools que suministra los cuatro dNTPs en una mezcla equimolecular a una concentración de 10 mM. Se añadieron a la reacción a una concentración final de 0,2 mM.

- ADN polimerasa.

En todas las reacciones de amplificación de ADN se utilizaron ADN polimerasas altamente termoestables. La enzima utilizada en cada reacción dependió del objetivo del experimento.

☒ *DNA polymerase* (Biotools): está producida por el organismo termófilo *Thermus thermophilus*. Se utilizó de forma rutinaria en los ensayos de comprobación e identificación de fragmentos clonados, plásmidos y ADN genómico, así como en otros ensayos en los que la fidelidad de la secuencia generada por la enzima no era un aspecto crucial. Se añadieron 0,5 unidades en cada 25 µL de reacción. La enzima necesita para su actividad Tampón de Reacción e ión Mg^{2+} ($MgCl_2$), suministrados de forma conjunta por el fabricante; se añadieron a una concentración final 1X.

☒ *Enzima PCR Extender Polymerase Mix* (5 Prime): Está producida por *Thermus aquaticus*. Se utilizó cuando el experimento requería una alta fidelidad en la secuencia del amplicón de interés o en las amplificaciones mayores de 3 kb. El fabricante suministra varios tampones de reacción junto con la enzima, se utilizó el recomendado por la casa comercial para cada caso particular, siempre a concentración final 1X. Se utilizó en todos los casos 1 unidad de enzima por cada 25 µL de reacción.

Todas las reacciones de PCR convencionales se llevaron a cabo en termocicladores GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). En el perfil del programa se incluyeron los siguientes pasos:

-*Desnaturalización inicial del ADN*: 94°C durante 5 minutos.

-*Ciclos de amplificación*: se programó un número variable entre 30 y 40 según los requerimientos de cantidad de producto de PCR del experimento. Los ciclos consistieron en una primera fase de desnaturalización (94°C durante 30 segundos), una fase de anillamiento de cebadores (temperatura variable dependiendo de la temperatura óptima de la pareja de cebadores utilizada, durante 30 segundos) y una tercera fase de elongación (72°C durante 0,5-5 minutos, tiempo variable en función del tamaño del amplicón que se deseaba amplificar, programando como criterio general 1 minuto por cada 1.000 pb, y en función de la eficiencia de síntesis de la ADN polimerasa utilizada).

-*Elongación final*: 72°C durante 7 minutos.

En experimentos en los que se deseó analizar la temperatura óptima de amplificación de un fragmento de ADN con una pareja de cebadores específica, se utilizó el termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf®), que permite aplicar temperaturas de anillamiento variables en cada columna del bloque.

Transcripción inversa (RT-PCR). Síntesis de ADNc

La transcripción inversa aprovecha la actividad de una transcriptasa inversa para generar copias de ADN complementario (ADNc) utilizando como molde ARN. Este tipo de PCR se llevó a cabo con el kit comercial PrimeScript™ RT Reagent (Takara Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 0,2 µL libres de ARNasas. En una reacción de 10 µL se añadieron los siguientes componentes, completando el volumen siempre con agua Milli-Q estéril tratada con DEPC:

- ARN total: tratado previamente con ADNasa para eliminar restos de ADN genómico (apartado 11 de Materiales y Métodos); se utilizaron 500 ng.
- Tampón de reacción: es suministrado por la casa comercial junto con los dNTPs e ión Mg²⁺; se añadió a una concentración final 1X.

- Cebador oligo-dT: se une de forma específica a la cola de poli-adenosinas de los ARN mensajeros transcritos en el momento en que se recogió la muestra, permitiendo su copia a ADNc; se añadió a una concentración final de 2,5 μ M.
- Transcriptasa inversa Prime Script RT: se añadieron 0,5 μ L.

La mezcla de reacción se sometió a una incubación de dos etapas en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems): una primera etapa a 37°C durante 15 minutos en la que se sintetiza el ADNc, y una segunda etapa a 85°C durante 5 segundos en la que se inactiva la transcriptasa inversa. El producto de reacción se utilizó inmediatamente después o se conservó a -80°C para su uso posterior.

La integridad del ADNc obtenido y la posible contaminación con ADN genómico se comprobaron mediante reacciones de PCR convencional para amplificar una región específica del gen codificante del factor de elongación EF1 α (Niño-Sánchez *et al.*, 2015) que incluye un intrón, lo que permite observar si el amplicón se ha obtenido a partir de ADN genómico o de ADNc por diferencia de tamaño en el propio amplicón.

PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real es una variante de la PCR convencional que, a diferencia de lo que ocurre con ésta última, permite visualizar la cinética de la reacción a tiempo real y no sólo el producto final. A partir de estudios basados en la relación cuantitativa existente entre la cantidad inicial de molde de la reacción y la cantidad de producto final obtenida (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993), se diseñaron distintos sistemas que permiten detectar el producto amplificado a medida que se va formando en los sucesivos ciclos de amplificación. Estos sistemas aprovechan la fluorescencia emitida por fluorocromos que se unen al ADN de doble cadena para usarla como indicador de la cantidad de amplicón producido en cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR cuantitativa, al verse incrementada la señal de fluorescencia de forma directamente proporcional a la cantidad de producto de reacción amplificado (Livak *et al.*, 1995).

El SYBR® Green es un fluorocromo de unión al surco menor de las moléculas de ADN de doble cadena. Se utilizó en este trabajo por su fácil manejo, su bajo coste y su capacidad para funcionar adecuadamente en una gran variedad de muestras y rangos de expresión variables.

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un volumen de 10 µL en placas multipocillo de 0,1 mL. A cada reacción se añadió el volumen correspondiente de KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™ (KAPA Biosystems) a una concentración final 1X, 600 nM de cada cebador y 1 µL del producto de la reacción de transcripción reversa. Se utilizó un termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en el que se programó el perfil recomendado por el equipo para este tipo de fluorocromos: una etapa de 2 minutos a 95°C, y 40 ciclos de amplificación de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Con el objetivo de comprobar la presencia de un producto de amplificación único y específico en la reacción, al final del programa de PCR se añadió un estudio de la curva de disociación con un perfil térmico de incrementos de 0,3°C cada 5 segundos en el rango de temperaturas 55-95°C. Como dato complementario a esta comprobación, los productos finales de la PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa.

En todas las reacciones de PCR cuantitativa se utilizaron cebadores diseñados para amplificar regiones de entre 100 y 130 pb, siguiendo las recomendaciones del fabricante del termociclador. Antes de utilizar los cebadores, se estudió la eficiencia de amplificación de cada pareja mediante la construcción de una recta patrón obtenida a partir de los datos de ciclo umbral (*Ct*, *threshold cycle*) de seis diluciones seriadas de ADN genómico usado como molde. Para todas las parejas de cebadores descritas en la Tabla 10 (Apéndice I) se obtuvo una eficiencia entre 96,8 y 102,1%.

El análisis de los datos obtenidos se realizó siguiendo el método de comparación de *Ct* (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001) que permite llevar a cabo una cuantificación relativa del nivel de expresión del gen de interés respecto de un gen control endógeno cuya expresión es constitutiva. En este trabajo se utilizó el gen

codificante del factor de elongación EF1 α como gen control endógeno para *F. oxysporum* y el gen que codifica para la actina en el caso de *P. vulgaris* (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Es necesaria una eficiencia de amplificación del gen de interés y del gen endógeno estadísticamente similares para poder aplicar de un modo fiable este método de cuantificación (Pfaffl, 2001).

El ciclo umbral (Ct, *threshold cycle*) de la reacción se define como el primer ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia detectada es mayor que el límite de detección mínimo, establecido por un umbral que está asociado con el inicio del crecimiento exponencial de la curva de amplificación del producto de PCR. De esta forma, una muestra que presente mayor contenido de ADN que otra llegará a la fase exponencial antes y tendrá un Ct más bajo que otra muestra con menor cantidad de ADN.

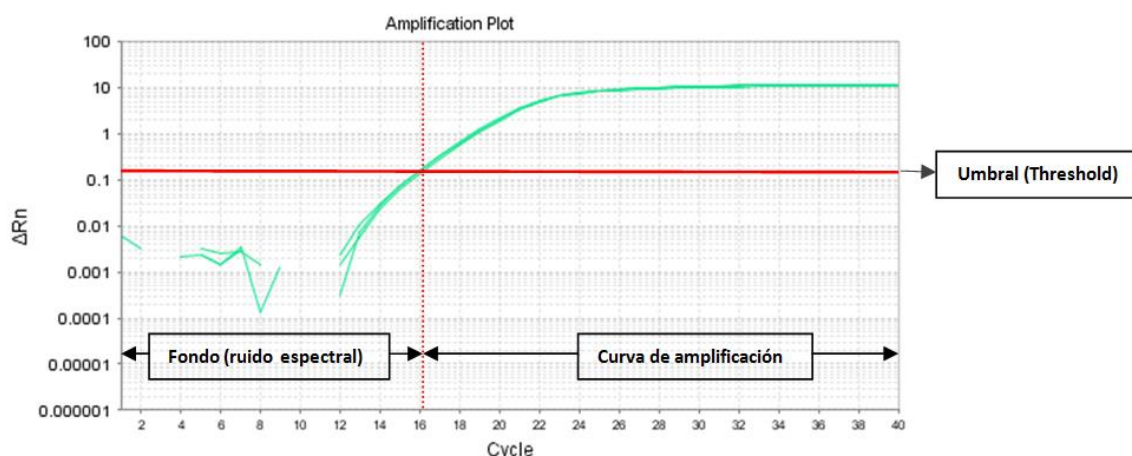


Figura 12. Curva de amplificación en PCR cuantitativa. El Ct se indica con una línea punteada vertical de color rojo. El umbral se indica con una línea continua horizontal de color rojo.

El método de comparación de Ct incluye los valores de Ct de interés en la siguiente fórmula matemática para así conocer la cantidad relativa de transcrito o RQ (*Relative Quantify of transcript*):

$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra referencia}}$, donde ΔCt en cada caso es la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen control endógeno.

La muestra referencia es aquella sobre la que se calibran todas las muestras problemas y a la que se asigna de forma arbitraria un valor RQ = 1.

Todos los análisis de PCR cuantitativa realizados en este trabajo se llevaron a cabo con muestras de al menos tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de síntesis de ADNc, realizando las reacciones por triplicado para su análisis en el termociclador, de modo que al menos hubo 18 reacciones de PCR para cada muestra analizada, siguiendo las indicaciones de de Vega-Bartol y colaboradores (de Vega-Bartol *et al.*, 2013).

Para los cálculos de Ct, eficiencia de amplificación y análisis estadísticos se utilizó el programa informático complementario del termociclador (StepOne™ Software V2.3, Applied Biosystems) y el programa Statistix 8.0.

Cuantificación relativa de biomasa fúngica

La cuantificación de biomasa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante la colonización de plantas de *P. vulgaris* se llevó a cabo mediante una estimación de la cantidad relativa de ADN del hongo respecto al ADN de la planta utilizando reacciones de PCR cuantitativa, tal y como se ha descrito para esta misma interacción planta-hongo en trabajos previos (Niño-Sánchez *et al.*, 2015; Niño-Sánchez *et al.*, 2016). En primer lugar se recogieron muestras del sistema radicular de plantas inoculadas con los aislados de interés de *F. oxysporum* a diferentes tiempos: 1, 2 y 3 dpi.

Para la detección y cuantificación del ADN fúngico se utilizaron las parejas de cebadores que amplifican regiones específicas de los genes *EF1 α* y *SGE1* (descritos en la Tabla 10, Apéndice I), ambos genes de copia única en el genoma del hongo. En el caso de *P. vulgaris* se utilizaron cebadores para amplificar una región del gen de la *Actina* (descritos en la Tabla 10, Apéndice I), también de copia única y que fue utilizado como gen control endógeno.

El número de muestras, los componentes de la reacción y el perfil térmico utilizados en esta cuantificación son las descritas anteriormente en este mismo apartado de Materiales y Métodos, utilizando en este caso como molde ADN genómico procedente de plantas infectadas y no ADNc. Se añadieron a la reacción 100 ng de ADN genómico.

La cantidad de producto amplificado se determinó como ya se detalló anteriormente, utilizando los mismos algoritmos matemáticos y con ayuda de las mismas herramientas bioinformáticas.

17.- Hibridaciones de ADN. Hibridación tipo *Southern blot*

Los experimentos de hibridaciones de ADN se llevaron a cabo siguiendo la estrategia de hibridación tipo *Southern blot* desarrollada por Southern (Southern, 1975).

Todas las hibridaciones se realizaron siguiendo en todo el procedimiento las recomendaciones generales de Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), del manual "*DIG Application Manual for Filter Hybridization*" (Roche) para el marcaje de sondas y detección de la señal, y del manual "*Hybond-N; nylon membrane*" (Amershan) para la transferencia de ácidos nucleicos a filtros.

Marcaje de sondas

Todas las sondas utilizadas se marcaron mediante una estrategia no radiactiva basada en la incorporación de dUTP conjugado con digoxigenina (DIG) en la síntesis de los fragmentos de ADN que sirvieron como sonda.

La digoxigenina es un esteroide procedente de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* que posee propiedades bioquímicas que le permiten unirse fácilmente a anticuerpos. Los anticuerpos utilizados son específicos y están conjugados con fosfatasa alcalina (anti-DIG-fosfatasa alcalina), enzima que actúa sobre un sustrato apropiado (CDP-Star) emitiendo quimioluminiscencia que puede ser detectada con un equipo de detección específico.

Para la generación de las sondas, en primer lugar se optimizaron las condiciones de la reacción de marcaje mediante PCR para obtener un amplicón único, definido y del tamaño esperado en cada caso. Posteriormente se llevó a cabo el marcaje sustituyendo en la mezcla de reacción de PCR los dNTPs estándar no conjugados por la mezcla comercial *Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix* (Roche). De forma paralela se realizó una reacción de PCR como control positivo en la que se añadieron dNTPs estándar. Mediante electroforesis en gel de agarosa se verificó el correcto marcaje de la sonda observándose que el fragmento amplificado en la PCR con dNTPs marcados es de un tamaño ligeramente superior al amplificado en la

PCR con dNTPs estándar debido al peso añadido que aporta la digoxigenina. Las sondas obtenidas se utilizaron inmediatamente o se conservaron a -20°C hasta su uso posterior. Tras su utilización se almacenaron a -20°C pudiéndose reutilizar en hibridaciones posteriores.

Hibridación de ADN digerido con enzimas de restricción

Digestión del ADN genómico

El ADN de interés, obtenido según se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos, se digirió con las enzimas de restricción (apartado 13 de Materiales y Métodos) que ofrecieron el rango de tamaños moleculares deseado. A la reacción de digestión se añadieron entre 10 y 15 μg de ADN genómico, íntegro y tratado con ARNasa, 30 unidades de la enzima de restricción y el tampón de reacción apropiado a una concentración 1X. Se incubó la reacción durante 16 horas a la temperatura óptima para cada enzima de restricción, y pasado este tiempo se añadieron 30 unidades más de enzima para facilitar la completa digestión del ADN; se incubó durante 2 horas más a la misma temperatura.

Una alícuota de las muestras de ADN digerido fue migrada en gel de agarosa al 1% (m/V) mediante electroforesis para verificar la completa digestión del ADN. El resto del ADN digerido se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 100% (V/V) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,2, e incubando a -80°C durante 2 horas. Posteriormente se recuperó el ADN por centrifugación a $13.200 \times g$ y 4°C durante 30 minutos; se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con 1 mL de etanol 70% (V/V) centrifugando cada vez a $7.500 \times g$ durante 5 minutos. El ADN precipitado y completamente seco se resuspendió en 20 μL de agua Milli-Q estéril.

Separación de los fragmentos digeridos

Las muestras de ADN digerido se cargaron en geles de agarosa al 1% (m/V) y se sometieron a electroforesis para una correcta separación de los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática. Se aplicó un voltaje de 4 V/cm durante 7-8 horas. Los geles se visualizaron con bromuro de etidio (apartado 14 de Materiales y Métodos) y se marcaron convenientemente para identificarlos y orientarlos.

Transferencia del ADN a membranas de nailon

Los geles se prepararon para la transferencia del ADN a membranas de nailon siguiendo cuatro fases consecutivas, todas a temperatura ambiente (22-25°C) y con agitación moderada:

- Depurinación: se realizó para crear mellas en el ADN y favorecer la transferencia de fragmentos de ADN mayores de 10 kb; para ello se expuso el gel a luz ultravioleta ($\lambda=260$ nm) durante 5 minutos.
- Desnaturalización: se sumergió el gel en la solución de desnaturalización (*) durante 15 minutos. Se repitió este paso con solución de desnaturalización nueva. Posteriormente se lavó el gel con agua destilada durante 5 minutos.
- Neutralización: el gel se sumergió en solución de neutralización (*) durante 15 minutos, y se repitió el lavado con solución de neutralización nueva.
- Equilibrado: se realizó sumergiendo el gel en solución SSC 10X (*) durante 10 minutos.

***Solución de desnaturalización**: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl.

Solución de neutralización: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl.

Solución SSC 10X: 1,5 M NaCl; 0,15 M citrato sódico; pH 7.

Posteriormente se transfirió el ADN desde el gel a una membrana de nailon. Para ello se utilizó una unidad de transferencia (Figura 13) que consistió en una bandeja de vidrio que contenía el tampón de transferencia SSC 10X, sobre la que se dispuso una placa de plástico lisa resistente, a modo de puente, cubierta por tres láminas superpuestas de papel Whatman 3MM cuyos extremos se sumergieron en el tampón de transferencia. Se colocaron tres láminas de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel y previamente humedecidas en SSC10X sobre los ya dispuestas en la lámina de plástico. Sobre estas láminas se dispuso el gel en posición invertida, eliminando todas las posibles burbujas de aire. Encima del gel se colocó una membrana de nailon (Nylon Hybond-N, GE Healthcare Life Sciences) de igual tamaño que el gel, debidamente marcada y orientada. Sobre ella se dispusieron tres láminas de papel Whatman 3 MM secas. Las partes del gel no cubiertas por la membrana o por las piezas de papel Whatman 3MM se forraron con láminas de papel plástico, asegurando que todo el tampón de transferencia atravesase exclusivamente el gel que quedó en

contacto con la membrana. Sobre toda la unidad de transferencia se colocó papel absorbente (hasta 10 cm de espesor) y sobre el conjunto se dispuso un peso de aproximadamente 1 kg.

Se dejó transferir el ADN del gel a la membrana por un mínimo de 16 horas, tras las cuales se retiró la membrana y se colocó entre dos láminas de papel Whatman 3MM seco. Posteriormente el ADN se fijó irreversiblemente a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta (Stratalinker®, Stratagene) durante unos segundos. La membrana se utilizó inmediatamente o se conservó a 4°C y en oscuridad entre dos papeles secantes hasta su utilización.

La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo el gel con una solución de bromuro de etidio en exceso y observando que no quedaba ADN digerido en cada carril.

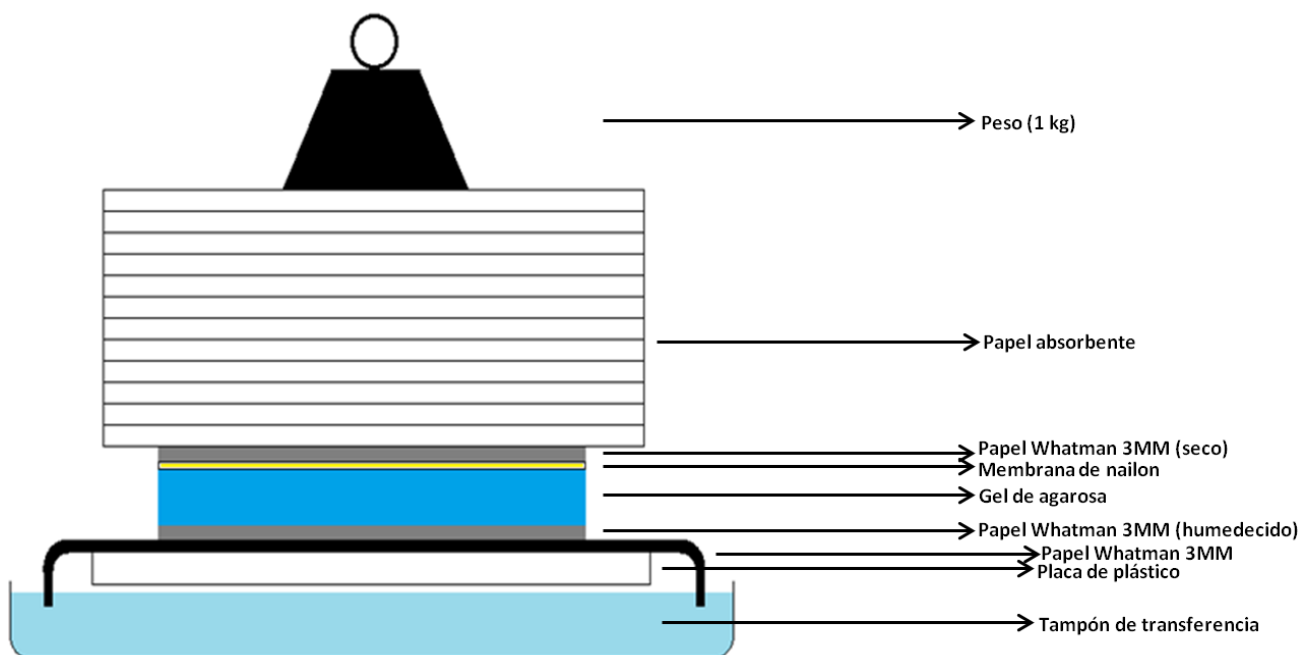


Figura 13. Unidad de transferencia en las hibridaciones de ADN.

Prehibridación e hibridación con la sonda

La prehibridación y posterior hibridación de las membranas con la sonda marcada se llevaron a cabo en tubos de vidrio herméticamente cerrados, con agitación circular moderada y constante, utilizando un volumen de 50 mL, suficiente para mantener las membranas siempre húmedas. La temperatura tanto de prehibridación

como de hibridación fue de 65°C para hibridaciones 100% homólogas, mientras que para hibridaciones no homólogas fue inferior adaptándose a cada caso particular.

En primer lugar se llevó a cabo la prehibridación incubando la membrana en la solución de prehibridación (*) durante al menos 1 hora. Posteriormente se hibridó la membrana añadiendo, en esa misma solución, la sonda previamente desnaturalizada por calor (100°C durante 10 minutos) y se incubó durante al menos 16 horas. En los casos en los que la sonda ya estaba diluida con anterioridad en solución de prehibridación, tras la fase de prehibridación se retiró la solución de prehibridación, que se conservó a -20°C, y se añadió la solución que contenía la sonda. Transcurrido el tiempo de la hibridación, se retiró la sonda y se conservó a -20°C para hibridaciones posteriores.

***Solución de prehibridación:** SSC 5X; N-laurilsarcosina 0,1 % (m/V); SDS 0,02% (m/V); reactivo bloqueante (Roche) 1% (m/V).

Lavados de la membrana y detección

Todos los lavados se llevaron a cabo con agitación moderada y constante, y con volúmenes mínimos, pero suficientes para mantener la membrana húmeda.

Los restos de sonda adheridos a la membrana se eliminaron con dos lavados consecutivos de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente (22-25°C) en solución de lavado 2X (*), seguidos de dos lavados de 15 minutos cada uno a la temperatura de hibridación en solución de lavado 0,1X (*).

La detección de la sonda se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando soluciones diluidas en tampón 1 (*). En primer lugar las membranas se equilibraron en tampón de lavado (*) durante 5 minutos. Posteriormente se bloquearon en tampón 2 (*) durante al menos 30 minutos. Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron en tampón 2 al que se añadió el anticuerpo anti-DIG-fosfatasa alcalina (Roche) en proporción 1:20.000 durante al menos 30 minutos. Se lavaron después las membranas dos veces en tampón de lavado durante 15 minutos en cada lavado para eliminar los restos de anticuerpo no unido a la sonda. Se equilibraron en tampón de detección (*) durante 5 minutos y se dispusieron sobre una lámina de papel de plástico, extendiendo sobre ellas de forma homogénea el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) diluido 1:100 en tampón de detección (el CDP-Star se usó a una

concentración final de 0,25 mM). Se añadió un volumen de sustrato quimioluminiscente mínimo, pero suficiente para cubrir toda la superficie de las membranas. Se cubrieron las membranas con otra lámina de papel de plástico eliminando posibles burbujas de aire formadas, y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos. Seguidamente se retiró el exceso de CDP-Star de las membranas, éstas se envolvieron con una lámina de papel de plástico evitando la formación de burbujas, y se procedió a detectar la quimioluminiscencia utilizando el equipo de detección *Intelligent Dark Box II* (Fujifilm).

***Tampón 1** (preparado en agua destilada): 100 mM ácido maleico; 150 mM NaCl; pH 7,5.

Solución de lavado 2X (preparada en agua Milli-Q estéril): SSC 2X; SDS 0,1% (m/V).

Solución de lavado 0,1X (preparada en agua Milli-Q estéril): SSC 0,1X; SDS 0,1% (m/V).

Tampón de lavado: tampón 1 con *Tween 20* 0,3% (V/V).

Tampón 2: tampón 1 con reactivo bloqueante 1% (m/V) (*Blocking Reagent*, Roche).

Tampón de detección (preparado en agua destilada): 100 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; pH 9,5.

Eliminación de la sonda

Para retirar completamente la sonda de las membranas tras la detección, se realizaron dos lavados a temperatura ambiente y agitación moderada y constante con solución de lavado 0,1X que se había llevado hasta ebullición. Se mantuvieron las membranas en esta solución durante 3 días realizando cada 24 horas un lavado con solución de lavado 0,1X nueva llevada a ebullición. Transcurrido este tiempo se secaron las membranas y se conservaron a 4°C y en oscuridad entre dos láminas de papel Whatman 3MM secas para ser utilizadas en hibridaciones posteriores.

18.- Análisis transcriptómicos

Los estudios de transcriptómica comparada llevados a cabo se basaron en la aplicación de la estrategia de secuenciación masiva de ARN (*RNA-seq*) desarrollada por Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2009). Esta estrategia permite comparar los perfiles transcriptómicos de varios aislados de una forma rápida y eficaz. El procedimiento parte de una población de ARN, bien total o bien enriquecida en ARNs mensajeros, a partir de la cual se generan moléculas de ADN complementario (ADNc) con la ayuda de una transcriptasa inversa que permiten obtener una genoteca para su

secuenciación posterior. Los fragmentos de ADNc generados se ligan a adaptadores en uno o en sus dos extremos para proceder a su secuenciación. Las lecturas que se obtengan por un lado serán alineadas al genoma de referencia de interés o se ensamblarán *de novo* para obtener la estructura transcripcional del organismo en cuestión; por otro lado, el nivel de cada transcrito, y por tanto el nivel de expresión de cada gen, vendrá determinado por el número de lecturas obtenidas para cada uno de esos transcritos.

En este trabajo se obtuvieron perfiles transcriptómicos de las estirpes del hongo de interés inducidos durante su crecimiento en medio líquido. Para la obtención del ARN, se inocularon esporas en medio líquido PDB a una concentración de 10^6 esporas/mL y se permitió su crecimiento a 25°C y 120 r.p.m. durante 48 horas bajo condiciones de iluminación permanente. Pasado este tiempo se recogió el micelio por filtración en vacío, se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido y se procedió a extraer el ARN total con el kit comercial SV Total RNA Isolation System Z3105 (Promega), tal y como se describió en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes la integridad de las muestras de ARN y se estimó la concentración por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se realizaron tres ensayos biológicos independientes obteniendo tres poblaciones de ARN para la estirpe control y la misma cantidad para la estirpe problema. Se utilizaron 5 µg de ARN total de cada una de las muestras para su secuenciación, en total tres muestras para cada estirpe.

La secuenciación de las muestras de ARN se llevó a cabo mediante la tecnología desarrollada por Illumina® Biosystems (www.biosystems.com). Las lecturas obtenidas tras la secuenciación fueron alineadas frente al genoma de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (genoma de referencia) utilizando el programa TopHat. Finalmente el programa CuffDiff fue utilizado para identificar las diferencias más significativas de expresión entre cada grupo de muestras.

19.- Secuenciación de ADN

Secuenciación de fragmentos de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN de interés se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca que dispone de un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El procedimiento seguido para la secuenciación es el descrito por Sanger y colaboradores (Sanger *et al.*, 1977), en el que se utilizan fluorocromos que son discriminados por un lector óptico.

Los fragmentos de ADN y los plásmidos a secuenciar fueron aislados y purificados con los kits de purificación NucleoSpin® PCR and Gel Clean-up y NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante para cada caso.

La concentración de las muestras se estimó mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para la secuenciación de amplicones de PCR se utilizaron 100 ng de ADN para fragmentos de 1 kb; para la secuenciación de ADN plasmídico se utilizaron entre 400 y 600 ng. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 8 µL que incluyó el cebador correspondiente a una concentración final de 3,2 pM.

Secuenciación de genomas de hongo

La secuenciación de genomas completos de estirpes fúngicas de interés se llevó a cabo mediante la tecnología de secuenciación masiva *Pacific Biosciences SMRT Sequencing (PacBio)* (McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Québec, Canadá). En la secuenciación de genomas de microorganismos esta tecnología presenta la ventaja, frente a otras tecnologías disponibles, de alcanzar lecturas superiores a las 20 kb facilitando así el ensamblaje *de novo* con resultados de alta calidad. La secuenciación basada en esta tecnología requiere ADN genómico de elevado peso molecular que conserve la mayor calidad y pureza posibles, por lo que la obtención del ADN se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la plataforma

Pacific Biosciences Sequencing (www.pacb.com) descritas en el apartado 11 de Materiales y Métodos.

La calidad del ADN que se deseaba secuenciar fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa tal y como se ha descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos. Como estimación de la concentración de ADN, en un carril del gel se incluyó una muestra del marcador de masa comercial *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen). La concentración se determinó de forma más precisa mediante fluorimetría en un Qubit® 3.0 (Invitrogen).

Para la secuenciación se enviaron 10 µg totales de cada muestra de ADN a la concentración recomendada por la plataforma *PacBio* (150-200 ng/µL).

20.- Programas informáticos y bases de datos

Programas informáticos

Geneious 8.0.5 (Biomatters)

Se utilizó este programa como base de datos personal de las distintas secuencias utilizadas en este trabajo. Se usó en el alineamiento de secuencias a través del propio programa de Geneious o a través de otros programas de alineamiento incorporados en esta versión (MUSCLE, CLUSTALW). También se usó en el diseño de cebadores y sondas y como herramienta en la edición gráfica de plásmidos.

Vector NTI Advance™ 9 (Invitrogen)

Se usó fundamentalmente en la edición de plásmidos y en el diseño de cebadores y sondas, así como en la visualización de los cromatogramas de secuenciación.

CuffDiff (Trapnell Lab - Cufflinks)

Se utilizó este programa (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/>) para identificar diferencias significativas de expresión en los análisis de transcriptómica comparada.

Phyre2 server

Se utilizó este servidor para la generación de estructuras tridimensionales de proteínas (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). El análisis de los modelos tridimensionales se llevó a cabo mediante el visor molecular *PyMOL* (Versión 1.2r3pre, Schrödinger, LLC; <https://www.pymol.org/>).

StepOne™ Software V2.3 (Life Technologies, Applied Biosystems)

Los cálculos, el análisis y la estadística de los datos tomados en las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron con este programa.

NanoDrop ND-1000 3.3 (Thermo Fisher Scientific)

Fue usado de manera rutinaria para el análisis de los datos espectrofotométricos obtenidos para la cuantificación de ácidos nucleicos.

LAS-1000 plus 1.31 (Fujifilm)

Se utilizó en la visualización de imágenes de quimioluminiscencia durante los ensayos de hibridación.

Alphamager MINI (Protein Simple)

Se usó en la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa mediante irradiación con luz ultravioleta.

LAS-Advanced Fluorescence Lite 1.8.2 (Leica Microsystems)

Fue utilizado en el montaje de imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal.

ACDSee v3.1b (ACD Systems)

Se utilizó en la adquisición de imágenes con cámara Leica DC300F (Leica Microsystems).

ImageJ 1.48, Adobe Photosop CS6

Se utilizaron en el diseño gráfico y la edición de imágenes para este trabajo.

Statistix 8.0

Este programa fue usado en los análisis estadísticos de todo el trabajo.

Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation)

Se utilizó como procesador de textos, así como editor de figuras y tablas.

Zotero Standalone 4.0

Fue utilizado como editor bibliográfico.

Bases de datos

Las bases de datos con las secuencias de genomas de interés o con los modelos tridimensionales para estructuras proteicas que fueron consultadas para este trabajo se mencionan a continuación:

- **Broad Institute:** <https://www.broadinstitute.org>
- **Joint Genome Institute:** <http://jgi.doe.gov>
- **Nacional Center for Biotechnology Information:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- **MUMDB: MIPS *Ustilago maydis* database:**
<https://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis/institute/groups/fungal-microbial-genomics/resources/mumdb/index.html>
- **InterPro: Protein sequence analysis and classification:**
<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

CAPÍTULO I

Regulación por carbono de la modulación de pH ambiental inducida por el metabolismo de hongos fitopatógenos

1.- INTRODUCCIÓN

La infección de plantas por hongos fitopatógenos se ve modulada por un amplio abanico de factores abióticos: concentración de nutrientes en la rizosfera, pH ambiental, temperatura o humedad relativa del ambiente, entre otros. De todos, el pH ambiental es uno de los factores que más influye en la patogenicidad y virulencia de los hongos, por lo que éstos han desarrollado mecanismos que les permiten adaptarse de una forma eficaz al hospedador y las condiciones que éste presenta.

Por un lado, el pH ambiental controla la expresión de un grupo diverso de genes codificantes para factores de patogenicidad. Esta expresión depende de una ruta de señalización con siete componentes (PacC, PalA, PalB, PalC, PalF, PalH y Pall) que actúan de manera integrada, siendo PacC el último de esta ruta (Arst Jr y Peñalva, 2003; Li y Mitchell, 1997; Peñalva y Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995). El pH ambiental es crucial en la regulación de esta ruta, así, en condiciones alcalinas, la forma inactiva de PacC sufre dos procesos proteolíticos consecutivos hasta llegar a su forma activa. Ésta última se trasloca al núcleo donde se une a la secuencia consenso 5'-GCCARG-3' activando la expresión de un grupo de genes denominados "genes alcalinos" y suprimiendo la de un grupo distinto de genes denominados "genes ácidos". Sin embargo, en condiciones de pH ácido, la forma inactiva de PacC no sufre proteólisis y se mantiene en el citoplasma viéndose inducida la expresión de "genes ácidos" y no así de "genes alcalinos" (Caracuel *et al.*, 2003; Mingot *et al.*, 1999; Orejas *et al.*, 1995; Suárez y Peñalva, 1996). El grupo de genes regulados por PacC incluye genes codificadores de CWDEs (pectato liasas, poligalacturonasas, pectina liasas, xilanasas, endopoligalacturonasas), de hidrofobinas o de proteínas de la ruta de síntesis del ácido oxálico, un conjunto de factores de patogenicidad que permite hacer frente a las respuestas defensivas del huésped y/o evitar ser reconocido por éstas, de forma que el proceso de infección llegue a término satisfactoriamente para el patógeno (Di Pietro *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha descrito a los hongos fitopatógenos como un sistema dinámico con capacidad para modificar el pH circundante, controlando así de una manera selectiva el tipo de factores de virulencia que se expresan en momentos específicos de la infección, modificación que depende de las condiciones de cada

hospedador, por lo que la estrategia utilizada por un patógeno puede ser diferente en función del hospedador colonizado (Prusky y Yakoby, 2003). La alcalinización del medio viene determinada por la acumulación de amonio secretado por parte del hongo, acumulación que en ciertos casos está relacionada directamente con un incremento de virulencia (Prusky *et al.*, 2001; Prusky *et al.*, 2004; Yakoby *et al.*, 2000; Yakoby *et al.*, 2001); mientras que la acidificación depende de una acumulación de ácidos orgánicos y/o de protones (Brandão *et al.*, 1992; Manteau *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2004; Rollins y Dickman, 2001) que median en la expresión de genes importantes para la virulencia (Caracuel *et al.*, 2003). En función de cuál de estas dos estrategias sigan, tradicionalmente los hongos fitopatógenos se han clasificado en “alcalinizadores” (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*) o “acidificadores” (*Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*) (Prusky y Yakoby, 2003). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que los hongos fitopatógenos no pertenecen a uno y otro grupo en sentido estricto, sino que modulan el pH ambiental en función del tipo de interacción que tengan con el hospedador y las condiciones nutricionales que encuentren en éste (Prusky *et al.*, 2016).

Numerosos son los estudios que han investigado la capacidad que tienen los hongos fitopatógenos para modular el pH de su hospedador gracias a su propio metabolismo (Davidzon *et al.*, 2010; Eshel *et al.*, 2002a; Eshel *et al.*, 2002b; Manteau *et al.*, 2003; Miyara *et al.*, 2010; Miyara *et al.*, 2012; Prusky *et al.*, 2001; Prusky *et al.*, 2004; Rollins y Dickman, 2001), rodeándose así de un ambiente con un pH óptimo para el desarrollo de la infección. Mientras que se conocen muchos aspectos del mecanismo que determina la modulación del pH del hospedador por parte del patógeno, pocos han sido los trabajos llevados a cabo para conocer cómo influyen las características del propio hospedador sobre el proceso infeccioso desencadenado por el hongo. El trabajo llevado a cabo en este Capítulo permitió conocer la influencia que muestra una de esas características, la concentración de la fuente de carbono, sobre la capacidad de *Fusarium oxysporum* para modular el pH ambiental.

2.- RESULTADOS

Influencia de la concentración de la fuente de carbono del medio en la modulación del pH ambiental por *F. oxysporum*

La disponibilidad de nutrientes en el hospedador es uno de los aspectos limitantes durante el desarrollo de la infección por parte del hongo patógeno, siendo la fuente de carbono uno de los nutrientes clave para el establecimiento del patógeno. Para estudiar su influencia en la capacidad de modulación del pH ambiental por parte de *F. oxysporum*, se llevó a cabo un estudio de la evolución del pH durante el crecimiento saprofítico del hongo en un medio de cultivo con distintas concentraciones de la fuente de carbono. Para este análisis se utilizó la estirpe silvestre poco virulenta FOP-SP4 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Se inocularon esporas recién obtenidas del hongo en 50 mL de medio de cultivo M3S a una concentración de 10^6 esporas/mL, se permitió el desarrollo de micelio durante 72 horas a 25°C y 150 r.p.m. Pasado este tiempo se recogió el micelio por filtración en vacío, se lavó con agua destilada estéril y se transfirió a 50 mL de medio de esporulación con pH inicial 5 y sacarosa como fuente de carbono a una concentración final de 175 mM o de 15 mM. Los cultivos se incubaron a 25 °C y 150 r.p.m. durante un período máximo de 72 horas, tomando muestras de medio de cultivo a intervalos de 24 horas que se utilizaron para analizar la evolución del pH a lo largo del tiempo. Se realizaron seis repeticiones independientes para cada uno de los medios de cultivo (seis para el medio de esporulación con sacarosa 175 mM, seis para el medio de esporulación con sacarosa 15 mM). Los restos de micelio de las muestras de medio de cultivo se eliminaron por centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos y se determinó el pH de la solución restante, tomando siempre como valor 0 hpi el valor de pH del medio sin hongo. La Figura 14 representa el resultado medio de los valores de pH determinados en las seis repeticiones independientes para cada uno de los medios.

Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de alcalinización de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en medio de cultivo con la fuente de carbono a una concentración de 15 mM, alcalinización que implicó un incremento de 1,65 puntos de

valor de pH desde el momento inicial del ensayo hasta las 72 hpi. Por el contrario, en medio de cultivo con la fuente de carbono a una concentración de 175 mM, el pH se mantuvo constante a lo largo del tiempo.

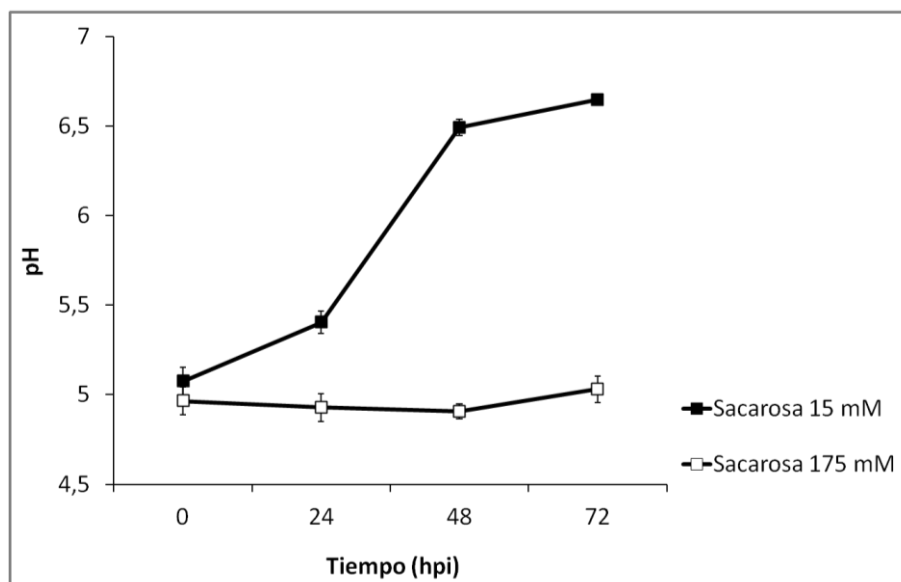


Figura 14. Efecto de la concentración de la fuente de carbono del medio de cultivo en la evolución del pH en cultivos *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se cultivó el hongo en medio rico M3S durante 3 días y posteriormente el micelio se transfirió a medio de esporulación con pH inicial 5 y con sacarosa 175 mM (cuadrados blancos) o con sacarosa 15 mM (cuadrados negros). Los valores de pH se determinaron en muestras del medio de cultivo tomadas a intervalos de 24 horas durante un período máximo de 72 horas. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de seis experimentos biológicos independientes.

Para conocer qué moléculas eran responsables de la modulación de pH observada, se determinó la concentración de amonio y de ácido glucónico acumulados en las muestras de medio de cultivo tomadas para la evaluación del pH a lo largo del tiempo. La determinación de la concentración de amonio se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit comercial *Ammonium test* (Merck) descritas en el apartado 8 de Materiales y Métodos; la de la concentración de ácido glucónico se realizó utilizando el test *D-Gluconic acid / D-Glucono- δ -lactone UV-method* de la casa comercial r-biopharm (Roche) y siguiendo las indicaciones detalladas en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Se llevaron a cabo mediciones en muestras procedentes de seis cultivos independientes para cada uno de los tiempos evaluados. En la Figura 15 se presentan los resultados medios con la determinación de la concentración de amonio y de ácido glucónico en los dos medios evaluados para todos los tiempos.

Los datos de concentración de amonio determinados (Figura 15A) indicaron una relación directa entre la capacidad de alcalinización y la acumulación de amonio en el medio, que alcanzó valores de 0,19 mM a las 72 hpi cuando el medio de cultivo utilizado contenía sacarosa 15 mM como fuente de carbono. Cuando se utilizó medio de cultivo con sacarosa 175 mM como fuente de carbono no se observó acumulación de amonio en el medio. Por otra parte, se observó un incremento en la concentración de ácido glucónico hasta 0,047 mg/mL a las 72 hpi cuando el hongo fue cultivado en medio con sacarosa 175 mM; durante el crecimiento del hongo en medio con sacarosa 15 mM no se observó acumulación de ácido glucónico en el medio extracelular (Figura 15B).

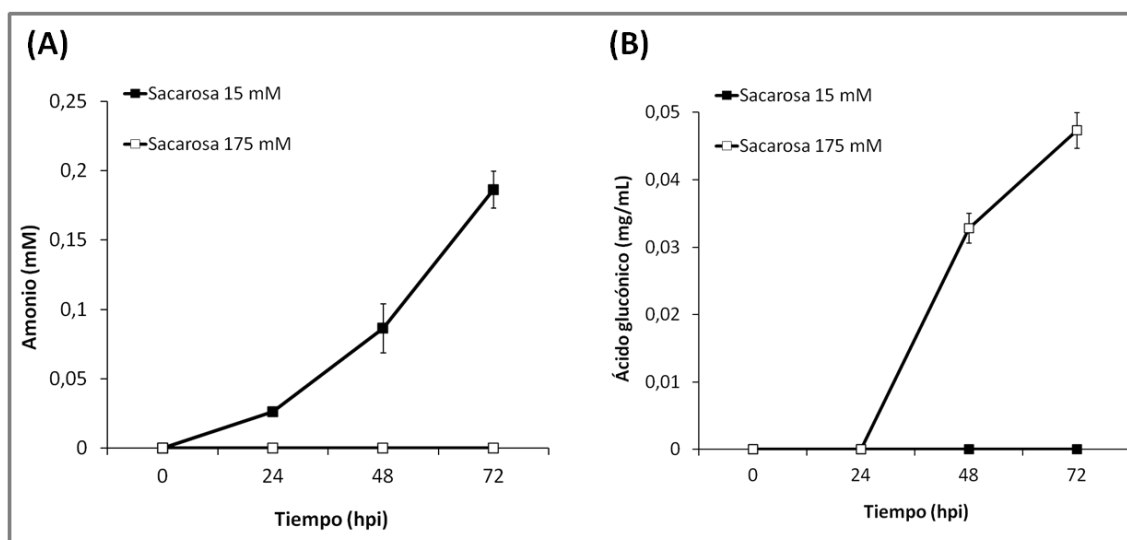


Figura 15. Efecto de la concentración de la fuente de carbono del medio de cultivo en la secreción de amonio (A) y ácido glucónico (B) en cultivos *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se cultivó el hongo en medio rico M3S durante 3 días y posteriormente el micelio se transfirió a medio de esporulación con pH inicial 5 y con sacarosa 175 mM (cuadrados blancos) o con sacarosa 15 mM (cuadrados negros). Los valores de concentración de amonio y ácido glucónico se determinaron en muestras del medio de cultivo tomadas a intervalos de 24 horas durante un período máximo de 72 horas. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de seis experimentos biológicos independientes.

Influencia de la concentración de la fuente de carbono del medio en la expresión génica en *F. oxysporum*

La regulación génica que subyace a la modulación del pH ambiental por parte de los hongos fitopatógenos ha sido ampliamente estudiada, habiéndose descrito que

el regulador que controla esa capacidad para modular el pH es el factor de transcripción PacC (Caracuel *et al.*, 2003; Orejas *et al.*, 1995; Suárez y Peñalva, 1996). Nuestros resultados han indicado que la concentración de la fuente de carbono en el medio determina el tipo de modulación del pH ambiental que induce el patógeno durante su crecimiento. Teniendo en cuenta que se conoce que el patrón de expresión del gen *PacC* viene determinado por las condiciones de pH ambiental en las que está creciendo el hongo, nos propusimos conocer si, en último término, la concentración de la fuente de carbono en el medio determina modificaciones en dicho patrón de expresión. Para ello se llevó a cabo un análisis de expresión mediante RT-qPCR en muestras de micelio incubadas en dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de fuente de carbono, sacarosa 175 mM y 15 mM. La obtención de las muestras de micelio se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento, en las mismas condiciones de cultivo y los mismos tiempos que se describieron en el epígrafe anterior. Se realizaron seis repeticiones independientes para cada uno de los medios de cultivo utilizados. El micelio fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. Se aisló ARN total de las muestras de micelio siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 11 de Materiales y Métodos y se utilizó en reacciones de RT-qPCR para conocer la expresión génica del gen *PacC* utilizando como gen endógeno el gen codificante del factor de elongación EF1 α de *F. oxysporum*. Para evaluar la expresión a tiempo 0 hpi se tomaron muestras de micelio en el momento previo al paso a los medios de inducción correspondientes.

La Figura 16 representa la expresión del gen *PacC* en las dos condiciones de cultivo descritas. En las muestras de micelio procedentes de cultivos incubados en medio con sacarosa 175 mM, en las que no se observó variación alguna en los valores de pH del medio de cultivo, los niveles de expresión relativa del gen *PacC* se mantuvieron constantes durante todo el ensayo; sin embargo, en las muestras de micelio procedentes de cultivos incubados con una concentración de sacarosa reducida a 15 mM se observó un incremento progresivo en los niveles de expresión de *PacC* hasta alcanzar su valor máximo a las 72 hpi.

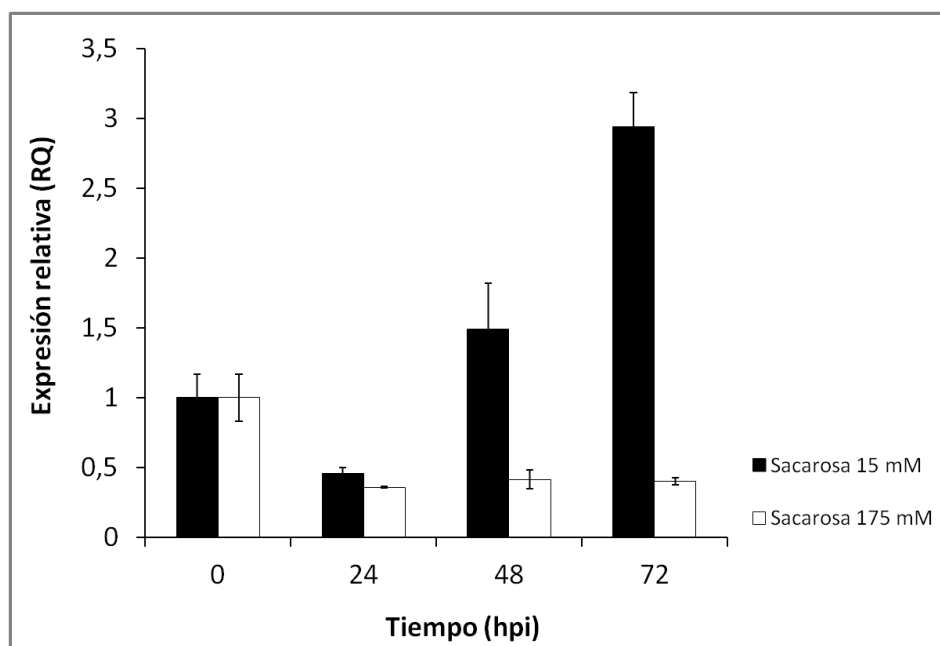


Figura 16. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión *in vitro* del gen *PacC* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se evaluó la expresión del gen mediante análisis RT-qPCR en muestras de micelio tomadas de cultivos fúngicos incubados en medio con la fuente de carbono a una concentración de 175 mM (barras blancas) o de 15 mM (barras negras). Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen *EF1α* como gen endógeno. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor de expresión obtenido para cada medio de cultivo a las 0 hpi (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de seis experimentos biológicos independientes.

La inducción de la expresión de *PacC* en condiciones alcalinas nos hace suponer que la expresión de los genes regulados por este factor de transcripción también estará influenciada en último término por la concentración de la fuente de carbono en el medio. Se realizó un análisis de expresión por RT-qPCR de una selección de genes cuya regulación está mediada previsiblemente por el factor de transcripción *PacC* para conocer cuáles se expresan de forma diferencial en función de la concentración de fuente de carbono en la que se cultivó el hongo. La selección de genes para el análisis se llevó a cabo utilizando como referencia los resultados transcriptómicos obtenidos en el hongo *C. gloeosporioides* (Alkan *et al.*, 2013) que permitieron identificar genes cuya expresión se induce por *PacC* y genes cuya expresión se ve suprimida por acción de éste. En primer lugar se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de homólogos de los genes ya identificados en *C. gloeosporioides* en el genoma de la estirpe 4287 del hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, encontrándose homólogos para 15 “genes ácidos” y 11 “genes alcalinos” (Tabla 9).

“Genes ácidos”		“Genes alcalinos”	
FOXG_04395	Dihidroxi-dehidratasa ácida	FOXG_15423	Transportador de azúcares
FOXG_13111	Endo-1,4-β-manosidasa	FOXG_05948	Pectato liasa B
FOXG_03899	Permeasa de aminoácidos	FOXG_13640	Glicosidasa-hidrolasa
FOXG_09503	Glucan-endo-1,3-β-glucosidasa	FOXG_09221	Polisacárido-deacetilasa
FOXG_10952	Citocromo P450	FOXG_00122	ATPasa transportadora de calcio
FOXG_07472	Prolin-oxidasa	FOXG_11202	Transportador de azúcares STL1
FOXG_03892	Endopeptidasa	FOXG_11678	Permeasa de aminoácidos
FOXG_02432	NADH-flavin-oxidorreductasa	FOXG_12141	Transportador de amonio
FOXG_05286	Enzima dependiente de piridoxal-fosfato	FOXG_11739	Pectato liasa plyB
FOXG_00249	Δ-1-pyrrolin-5-carboxilato-deshidrogenasa	FOXG_07597	Histidín-fosfatasa ácida
FOXG_16878	Fosfatasa ácida	FOXG_17180	Peroxidasa
FOXG_09820	Fosforilcolin-fosfatasa		
FOXG_10481	Histona-lisina-N-metiltransferasa		
FOXG_00950	E3 ubiquitin-protein-ligasa		
FOXG_13051	Endopoligalacturonasa		

Tabla 9. “Genes ácidos” y “genes alcalinos” homólogos de *C. gloeosporioides* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se llevó a cabo una búsqueda tipo *BLASTN* de candidatos de *C. gloeosporioides* en el genoma de referencia de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* depositado en el *Broad Institute* (<https://www.broadinstitute.org>). En la primera columna de cada grupo de genes de la Tabla se indican los códigos de acceso de los *loci* seleccionados.

El análisis de expresión de los genes homólogos encontrados se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenido a partir de micelio del hongo cultivado en medio de esporulación bien con sacarosa 175 mM, bien con sacarosa 15 mM como fuente de carbono. El micelio se obtuvo tal y como se indicó anteriormente en este mismo Capítulo de Resultados. Se realizaron seis repeticiones biológicas independientes para

cada una de las condiciones ensayadas y se evaluó la expresión de los distintos genes a 24, 48 y 72 hpi. Tras las reacciones de PCR a tiempo real llevadas a cabo, sólo se obtuvieron amplificaciones para 7 de los 15 *loci* candidatos de “genes ácidos” y para 3 de los 11 *loci* candidatos de “genes alcalinos”, para el resto de candidatos no se consiguió amplificación alguna por lo que fueron descartados en el estudio.

La Figura 17 muestra los resultados de expresión obtenidos para los “genes ácidos” y la Figura 18, los obtenidos para los “genes alcalinos”. En ambos casos, para cada uno de los genes se presentan los resultados de expresión obtenidos en micelio cultivado en medio con sacarosa 175 mM (tonalidad oscura de cada color) y con sacarosa 15 mM (tonalidad clara de cada color).

La expresión de los 7 “genes ácidos” (Figura 17) analizados no mostró un perfil común para todos ellos. Los *loci* FOXG_09503 (Glucan-endo-1,3- β -glucosidasa), FOXG_10952 (Citocromo P450) y FOXG_00950 (E3 ubiquitín-protein-ligasa) mostraron una expresión mínima en los dos medios y los tres tiempos evaluados, en ningún caso se superó un nivel de expresión relativa de 1,5; el análisis estadístico *t*-test no reveló diferencias estadísticamente significativas entre la expresión en medio con sacarosa 175 mM y la expresión en medio con sacarosa 15 mM. El *locus* FOXG_10481 (Histona-lisina-N-metiltransferasa) mantuvo una expresión mínima a las 24 y 48 hpi en los dos medios, expresión que se incrementó a las 72 hpi en el medio con sacarosa 15 mM hasta valores de expresión relativa de 4,89, sin ser una diferencia estadísticamente significativa con la expresión en medio con sacarosa 175 mM en ese tiempo (RQ=2,08). Los *loci* FOXG_04395 (Dihidroxi-dehidratasa ácida) y FOXG_02432 (NADH-flavín-oxidoreductasa) a las 24 hpi presentaron una expresión ligeramente superior en medio con sacarosa 175 mM que en medio con sacarosa 15 mM, mientras que a las 48 y 72 hpi la expresión se incrementó en medio con sacarosa 15 mM para los dos genes; en ningún caso las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con la excepción de la diferencia observada a las 24 hpi para el gen FOXG_02432 (NADH-flavín-oxidoreductasa) ($P < 0,05$). Finalmente, la expresión del gen FOXG_13111 (Endo-1,4- β -manosidasa) presentó un incremento de expresión estadísticamente significativo a las 24 hpi en el medio con sacarosa 15 mM ($P < 0,0001$), diferencia de expresión que se mantuvo, aunque no de forma significativa, a las 48 hpi con un incremento en los valores de expresión respecto de los observados en el primer

tiempo evaluado (en medio con sacarosa 175 mM se incrementó de 0,28 a 1,13; en medio con sacarosa 15 mM, de 1 a 3,95); a las 72 hpi en los dos medios se observó un nivel de expresión muy elevado sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos (2.747,2 para el medio con sacarosa 175 mM; 4.103,3 para el medio con sacarosa 15 mM).

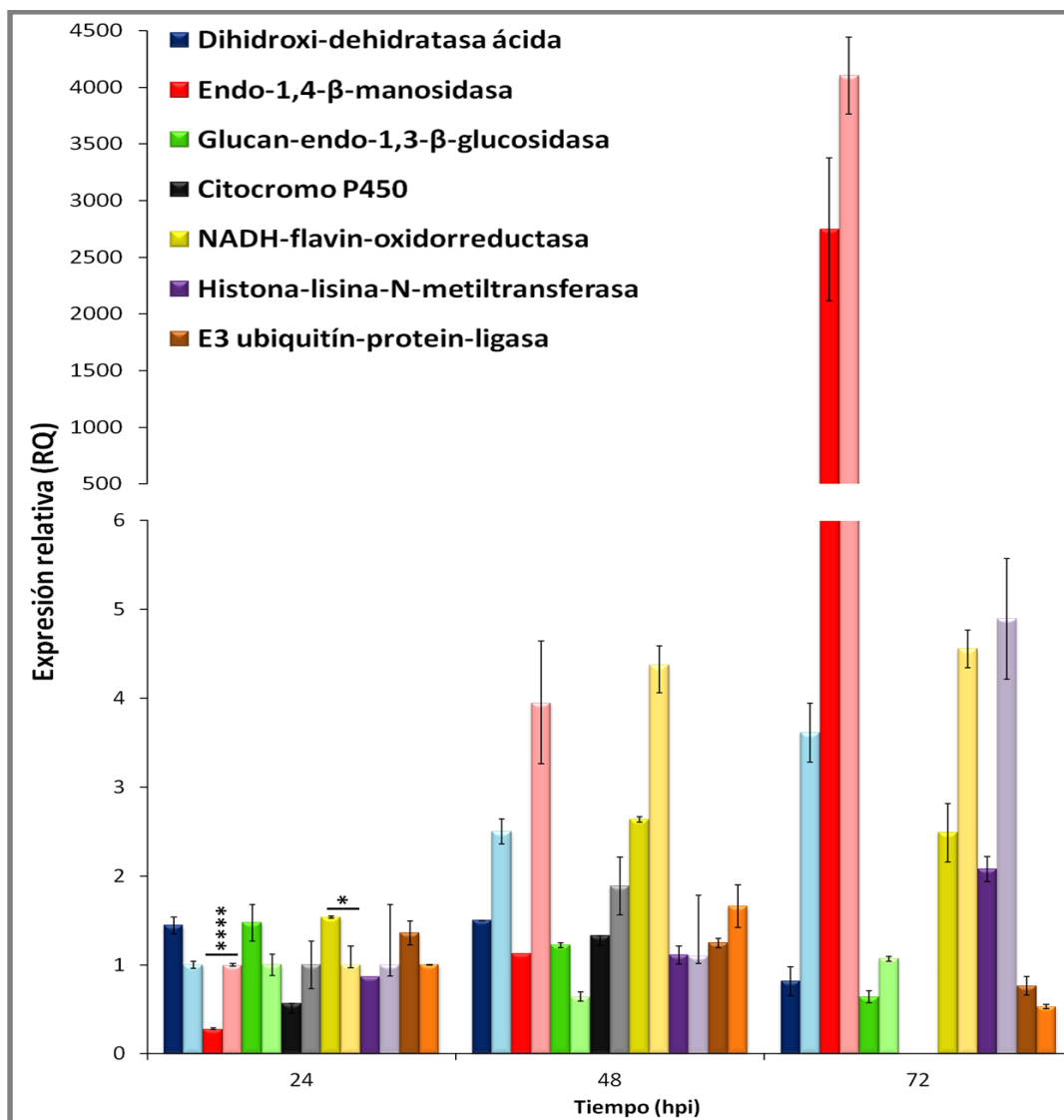


Figura 17. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión *in vitro* de “genes ácidos” de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se evaluó la expresión de los *loci* FOXG_04395, FOXG_13111, FOXG_09503, FOXG_10952, FOXG_02432, FOXG_10481 y FOXG_00950 mediante análisis RT-qPCR en muestras de micelio incubadas en medio con sacarosa 175 mM (barras en tonalidades oscuras) o 15 mM (barras en tonalidades claras). Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen *EF1α* como gen endógeno. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor de expresión obtenido para cada gen a las 24 hpi en el micelio procedente de cultivos en medio con sacarosa 15 mM (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media ± la desviación estándar de seis experimentos biológicos independientes. Las diferencias de expresión en ambos medios se evaluaron mediante un análisis *t*-test y se identifican como * ($P < 0,05$) y **** ($P < 0,0001$).

De los 3 “genes alcalinos” para los que se obtuvo amplificación en las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 18), el *locus* FOXG_15423 (Transportador de azúcares) presentó niveles de expresión no superiores a 1 a lo largo del tiempo en los dos medios analizados. La expresión del *locus* FOXG_07597 (Histidín-fosfatasa ácida) fue estadísticamente superior a las 24 hpi en medio con sacarosa 15 mM ($P < 0,05$); a las 48 y 72 hpi la expresión fue similar en ambos medios y menor que la expresión cuantificada a las 24 hpi, sin existir diferencias estadísticamente significativas en la expresión en ambos medios. El *locus* FOXG_00122 (ATPasa transportadora de calcio) a las 24 hpi se expresó por igual en los dos medios en valores de expresión relativa no superiores a 1,4; a las 48 y 72 hpi se observó un incremento de expresión en medio con sacarosa 15 mM hasta valores de expresión relativa de 12,7 (48 hpi) y 15,2 (72 hpi), mientras que en medio con sacarosa 175 mM el nivel de expresión se redujo a la mitad (0,5 a 48 hpi; 0,6 a 72 hpi); las diferencias de expresión observadas a 48 y 72 hpi fueron estadísticamente significativas según el análisis *t*-test llevado a cabo (a 48 hpi, $P < 0,0001$; a 72 hpi, $P < 0,05$).

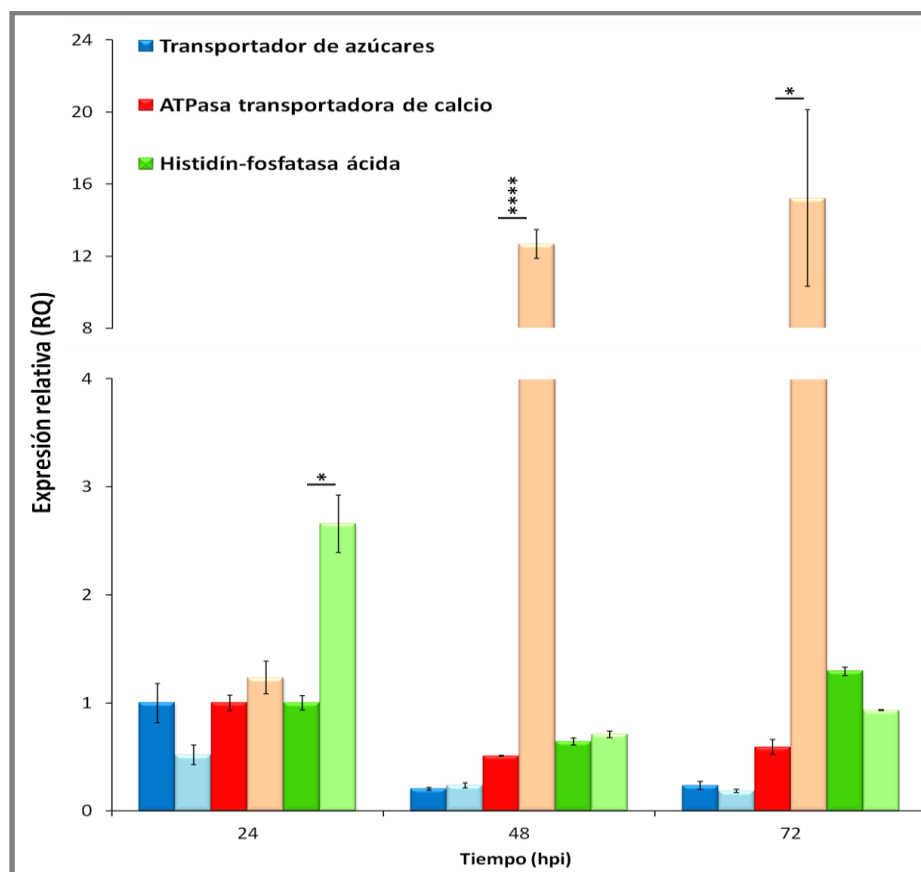


Figura 18. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la expresión *in vitro* de “genes alcalinos” de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se evaluó la expresión de los *loci* FOXG_15423, FOXG_00122 y FOXG_07597 mediante análisis RT-qPCR en muestras de micelio incubadas en medio con sacarosa 175 mM (barras en tonalidades oscuras) o 15 mM (barras en tonalidades claras). Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen *EF1α* como gen endógeno. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor de expresión obtenido para cada gen a las 24 hpi en el micelio procedente de cultivos en medio con sacarosa 175 mM (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de seis experimentos biológicos independientes. Las diferencias de expresión en ambos medios se evaluaron mediante un análisis *t*-test y se identifican como * ($P < 0,05$) y **** ($P < 0,0001$).

Parte de los resultados obtenidos en este Capítulo se incluyó en una publicación que describe el papel de la fuente de carbono en la regulación de la modulación del pH ambiental y finalmente la patogenicidad en hongos fitopatógenos (Bi *et al.*, 2015).

3.- DISCUSIÓN

La capacidad de los hongos fitopatógenos para modular el pH ambiental ha sido descrita en diversas especies entre las que se incluyen miembros del género *Penicillium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* o *Fusarium oxysporum* (Davidzon *et al.*, 2010; Eshel *et al.*, 2002a; Eshel *et al.*, 2002b; Manteau *et al.*, 2003; Miyara *et al.*, 2010; Miyara *et al.*, 2012; Prusky *et al.*, 2001; Rollins y Dickman, 2001). Esta modulación del pH se ha asociado con la producción de pequeñas moléculas orgánicas de distinto tipo, habiéndose descrito la producción y secreción de amonio en especies del género *Colletotrichum* (Alkan *et al.*, 2008; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2008; Miyara *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2012), en *A. alternata* (Eshel *et al.*, 2002a; Eshel *et al.*, 2002b) y en *F. oxysporum* (Miyara *et al.*, 2012), y la secreción de ácidos orgánicos (glucónico, cítrico, oxálico) y/o de protones en especies del género *Penicillium* (Miyara *et al.*, 2010; Prusky *et al.*, 2004), en *Aspergillus niger* (Ruijter *et al.*, 1999), en *B. cinerea* (Manteau *et al.*, 2003) o en *S. sclerotiorum* (Bateman y Beer, 1965). Si bien la acumulación de estas pequeñas moléculas no siempre se correlaciona con la modulación del pH, en ciertos casos no sólo se han correlacionado sino que además se ha establecido una relación clara entre la capacidad de modulación del pH del hospedador con un incremento en la capacidad patogénica que presentan los patógenos. En el caso de *Colletotrichum* spp. se ha descrito en detalle la relación directa entre la acumulación de amonio en fruto y la alcalinización del mismo, lo que determina un incremento en la capacidad patogénica del hongo (Alkan *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2009; Miyara *et al.*, 2010). En *P. expansum* también se ha descrito ese incremento en la capacidad de patogenicidad, pero en este caso a través de la acidificación del medio mediada por la secreción de ácido glucónico (Barad *et al.*, 2014).

Todos estos trabajos han permitido conocer en profundidad los mecanismos por los que el metabolismo fúngico modula el pH ambiental; sin embargo, no se tiene un conocimiento tan preciso acerca de la influencia que muestran las distintas características propias del hospedador sobre la capacidad patogénica del hongo. Durante la maduración de frutos, momento en el que se ha descrito la incidencia de un número considerable de infecciones de origen fúngico, se desencadenan una serie de

cambios físico-químicos entre los cuales es relevante la acumulación de azúcares. Si la modulación del pH ambiental por parte de los patógenos determina directamente una mejor capacidad de colonización del hospedador, y el incremento en la concentración de fuentes de carbono en el mismo provoca una alteración en la susceptibilidad de éste a enfermedades fúngicas, parece claro que la concentración de la fuente de carbono presente en el hospedador modula la capacidad para variar el pH ambiental por parte del patógeno y, en último término, para incrementar su capacidad patogénica. *F. oxysporum* es un patógeno radicular que se encuentra creciendo en la rizosfera en condiciones saprofiticas. En esta rizosfera, los exudados procedentes de las raíces del hospedador suponen un atrayente químico para los microorganismos capaces de colonizar los vegetales. Se ha descrito que el componente mayoritario de estos exudados son los azúcares (Compant *et al.*, 2010; Lugtenberg *et al.*, 1999), por lo que no es descabellado suponer que, al igual que ocurre con patógenos de post-cosecha, la concentración de fuente de carbono en la rizosfera procedente del hospedador determine una capacidad de colonización más o menos eficaz para los microorganismos rizosféricos.

En este trabajo hemos descrito la influencia que muestra la concentración de la fuente de carbono disponible en el medio sobre la capacidad de *F. oxysporum* para modular el pH ambiental. Durante su crecimiento saprofitico en presencia de sacarosa a una concentración de 175 mM, la estirpe FOP-SP4 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no muestra variaciones en el valor del pH del medio en el que está creciendo, mientras que en presencia de la misma fuente de carbono a una concentración reducida hasta 15 mM muestra un incremento de valor de pH de 1,65 puntos (desde valor inicial 5 hasta valor 6,65 a las 72 horas tras la inoculación en el medio). Estos resultados nos permiten afirmar que *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se comporta como hongo “alcalinizador”, al menos en las condiciones y tiempos analizados en este trabajo, carácter alcalinizador que ya había sido descrito en otros trabajos para otras formas especiales del complejo de especies *F. oxysporum* (Miyara *et al.*, 2012; Prusky y Yakoby, 2003). Para confirmar si la modulación de pH observada en *F. oxysporum* estaba relacionada con la secreción de pequeñas moléculas al medio como se ha observado en otros hongos fitopatogénicos, se cuantificó el amonio y el ácido glucónico acumulados en el medio extracelular durante el crecimiento saprofitico del hongo. De

esta forma se observó acumulación de amonio durante el crecimiento saprofito en presencia de sacarosa 15 mM y de ácido glucónico durante el crecimiento en presencia de sacarosa 175 mM, si bien la cantidad máxima de ácido acumulada fue muy baja (0,047 mg/mL a las 72 hpi) en comparación con los valores descritos en hongos “acidificadores” como *Penicillium expansum* (5,25 mg/mL a las 72 hpi) cultivado en las mismas condiciones (Barad *et al.*, 2012). Estos resultados, por tanto, nos permiten relacionar la capacidad de alcalinización del hongo con la secreción de amonio al medio extracelular ante una situación de baja concentración de fuente de carbono en el medio de crecimiento.

Se ha demostrado en diversos sistemas modelo que el máximo responsable de la regulación de la capacidad de modulación del pH ambiental por hongos fitopatógenos es el factor de transcripción PacC (Arst Jr y Peñalva, 2003; Li y Mitchell, 1997; Peñalva y Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995). Éste, que se traduce en forma de péptido inactivo, se vuelve activo en condiciones alcalinas gracias a la proteólisis que sufre la forma inactiva (Arst Jr y Peñalva, 2003; Caracuel *et al.*, 2003; Orejas *et al.*, 1995; Prusky y Yakoby, 2003). Si la capacidad de alcalinización viene determinada por la concentración de fuente de carbono en el medio, como ha quedado demostrado en este trabajo, parece claro que la activación de PacC está influenciada en último término por dicha concentración. Para confirmar este supuesto se evaluó la expresión del gen *PacC* en muestras de micelio incubadas en medio con elevada (175 mM) y con baja (15 mM) concentración de sacarosa. Nuestros resultados corroboraron los datos ya conocidos acerca de la activación de *PacC* en condiciones alcalinas, al observarse un incremento progresivo en la expresión del gen en medio con sacarosa 15 mM hasta alcanzar valores aproximadamente tres veces superiores a las 72 hpi a los cuantificados al inicio del crecimiento fúngico en el medio; sin embargo, y como era de esperar, la expresión del gen *PacC* no presentó variaciones en medio con sacarosa 175 mM (condiciones ácidas).

Los resultados de expresión de *PacC*, junto con los datos obtenidos de cuantificación de pequeñas moléculas orgánicas nos permiten, por tanto, establecer un modelo de interacción de varios elementos (Figura 19): la baja concentración de fuente de carbono en el medio determina la acumulación de amonio, la cual es responsable de la alcalinización del medio. Esta alcalinización determinaría la

activación de la expresión del gen *PacC*. De forma global, por tanto, este sistema permite al hongo modular el pH ambiental para alcanzar las condiciones óptimas que le permitan desarrollar el proceso infectivo de manera exitosa.

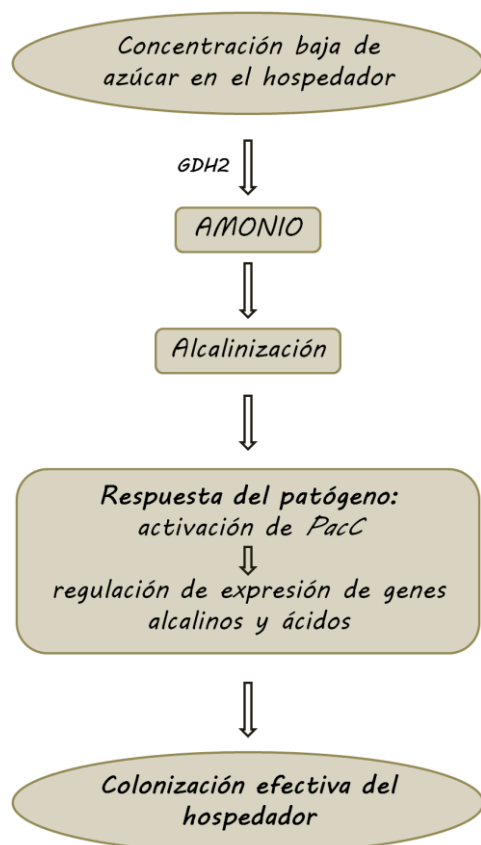


Figura 19. Modelo de interacción entre los elementos que modulan la capacidad patogénica en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (modificado de Prusky *et al.*, 2016).

La activación de PacC supone el último paso de la ruta de señalización encargada de regular la respuesta fúngica al pH ambiental (Arst Jr y Peñalva, 2003; Li y Mitchell, 1997; Peñalva y Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995), respuesta que implica la regulación de la expresión de un conjunto de genes durante el crecimiento del patógeno. Por un lado la inducción de la expresión de los conocidos como “genes alcalinos” y por otro lado la supresión de la expresión de los denominados “genes ácidos” (Alkan *et al.*, 2013; Di Pietro *et al.*, 2003; Ment *et al.*, 2015; Peñalva y Arst, 2002; Tilburn *et al.*, 1995). A partir del modelo de interacción entre los diversos elementos que modulan la capacidad patogénica del hongo propuesto en este trabajo y de los datos ya conocidos acerca del papel regulador que presenta PacC, podemos inferir una regulación de la expresión de estos grupos de genes mediada por la concentración de fuente de carbono en el medio de crecimiento para el patógeno. Para confirmarlo, se llevó a cabo un análisis de expresión mediante RT-qPCR de una

selección de genes homólogos (Tabla 9) a los identificados en los análisis transcriptómicos de *C. gloeosporioides* con regulación previsiblemente mediada por PacC (Alkan *et al.*, 2013; Ment *et al.*, 2015). La expresión de los “genes ácidos” seleccionados se esperaría inducida durante el crecimiento en condiciones ácidas, según los datos obtenidos para *C. gloeosporioides* (Ment *et al.*, 2015); sin embargo, nuestros resultados muestran que *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no acidifica el medio en nuestras condiciones de trabajo, y es precisamente esto lo que determina que la expresión de los candidatos analizados no se muestre claramente inducida en el medio con mayor concentración de sacarosa (medio que presumiblemente se considera inductor de condiciones ácidas).

Respecto a los “genes alcalinos” seleccionados, conociendo que la activación de su expresión se produce en condiciones alcalinas según los resultados obtenidos en otros trabajos (Alkan *et al.*, 2013; Caracuel *et al.*, 2003; Ment *et al.*, 2015), se esperaría una inducción en su expresión cuando el hongo se cultiva en presencia de una concentración reducida de fuente de carbono, situación en la que hemos demostrado que *F. oxysporum* alcaliniza el medio extracelular. Este planteamiento se confirma con los resultados obtenidos para los genes FOXG_00122 (gen codificador para una ATPasa transportadora de iones calcio al interior del retículo endoplasmático (Kb y Mg, 1998)) y FOXG_07597 (codificador para una histidín-fosfatasa ácida que fosforila de forma transitoria histidinas en posiciones concretas de proteínas celulares durante su degradación catalítica (Dj, 2008)), cuyos niveles de expresión se encuentran significativamente incrementados en situación de baja concentración de fuente de carbono a las 48 y 72 hpi, y a las 24 hpi, respectivamente. La activación de estos dos genes nos permite plantear la hipótesis que implica el aprovechamiento de fuentes alternativas de carbono (aminoácidos procedentes de degradación proteica, por ejemplo) como medio para obtener energía celular, energía que también se obtendría en reacciones bioquímicas no relacionadas con el catabolismo de nutrientes habituales para la célula (obtención de ATP a través de gradientes de cargas creados en diferentes espacios celulares, como pueden ser el espacio citoplasmático y el lumen del retículo endoplasmático).

El estudio presentado en este trabajo nos ofrece una aproximación global a los factores principales que median en la modulación de pH. Sin embargo aún queda

mucho por conocer en este área, fundamentalmente qué ocurre con la expresión del gen codificador para el factor de transcripción CreA, regulador central de la represión por catabolito. CreA es un regulador negativo que suprime la expresión de genes que codifican para proteínas necesarias durante la utilización de fuentes de carbono no preferidas. En *C. gloeosporioides* y *P. expansum* se sabe que la expresión del gen *CreA* se induce progresivamente durante el crecimiento del hongo en medio de cultivo con concentraciones crecientes de sacarosa (Bi *et al.*, 2015), de forma que se favorece el aprovechamiento de este azúcar cuando se encuentra en el medio y el de otras fuentes de carbono cuando se encuentra en baja concentración. Cabe pensar que en el hongo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocurra algo similar, pero no debemos olvidar que se trata de un hongo con una estrategia de colonización diferente a los dos citados, por lo que falta por confirmar si CreA está regulado de igual modo por la concentración de la fuente de carbono en el medio en nuestro modelo de estudio.

Recientemente se ha descrito que el complejo de especies *F. oxysporum* presenta homólogos de los péptidos para la alcalinización (RALF) de plantas, péptidos que inducen la alcalinización en tejidos del hospedador cuando éste es inoculado con el patógeno (Masachis *et al.*, 2016; Thynne *et al.*, 2016). Los distintos grupos de investigación que trabajan en este sentido no se han puesto de acuerdo acerca de una posible implicación de estos péptidos en la capacidad patogénica del hongo, por lo que sería muy interesante conocer qué ocurre en el sistema de trabajo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* respecto a la participación de estos péptidos RALF-like en la modulación de la patogenicidad del hongo mediada por la capacidad que presenta éste para alcalinizar el medio que, como hemos demostrado, viene determinada en buena parte por la concentración de la fuente de carbono presente en el hospedador.

CAPÍTULO II

FTF2, factor de virulencia en *Fusarium oxysporum*

1.- INTRODUCCIÓN

El factor de transcripción *FTF2* está codificado por el gen homónimo *FTF2* y es uno de los dos miembros que componen la familia génica *FTF* en *F. oxysporum*. Los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación nos han permitido identificar a los factores de transcripción codificados por esta familia génica como elementos reguladores de la virulencia en el complejo de especies *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Mientras que *FTF1* se localiza en regiones correspondientes al genoma adaptativo, *FTF2* se encuentra en el cromosoma 9 que corresponde al genoma central o *core genome*. Los estudios bioinformáticos realizados nos han permitido describir a *FTF2* como un gen de naturaleza interespecífica del que se han encontrado homólogos en todos los ascomicetos filamentosos del *subphylum* Pezizomycotina (Euascomycota) con una homología próxima al 100% en la mayoría de ellos; sin embargo, no se ha encontrado en ascomicetos levaduriformes, basidiomicetos, zygomycetos o quitridiomycetos (Niño-Sánchez *et al.*, 2016) (Figura 20).

Además de las diferencias descritas entre los dos miembros de la familia génica *FTF* en cuanto a su distribución en el reino Fungi, los estudios realizados en nuestro grupo de investigación han posibilitado el conocimiento de otras diferencias entre ambos. Así, se han observado diferencias en cuanto al número de copias existentes en el genoma de *F. oxysporum* para ambos genes: mientras *FTF2* es un gen de copia única, *FTF1* es un gen multicopia con un número de copias variable en las distintas estirpes de *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007) existiendo una correlación directa entre el número de copias y el grado de virulencia de las estirpes en la forma especial *phaseoli* (de Vega-Bartol *et al.*, 2011).

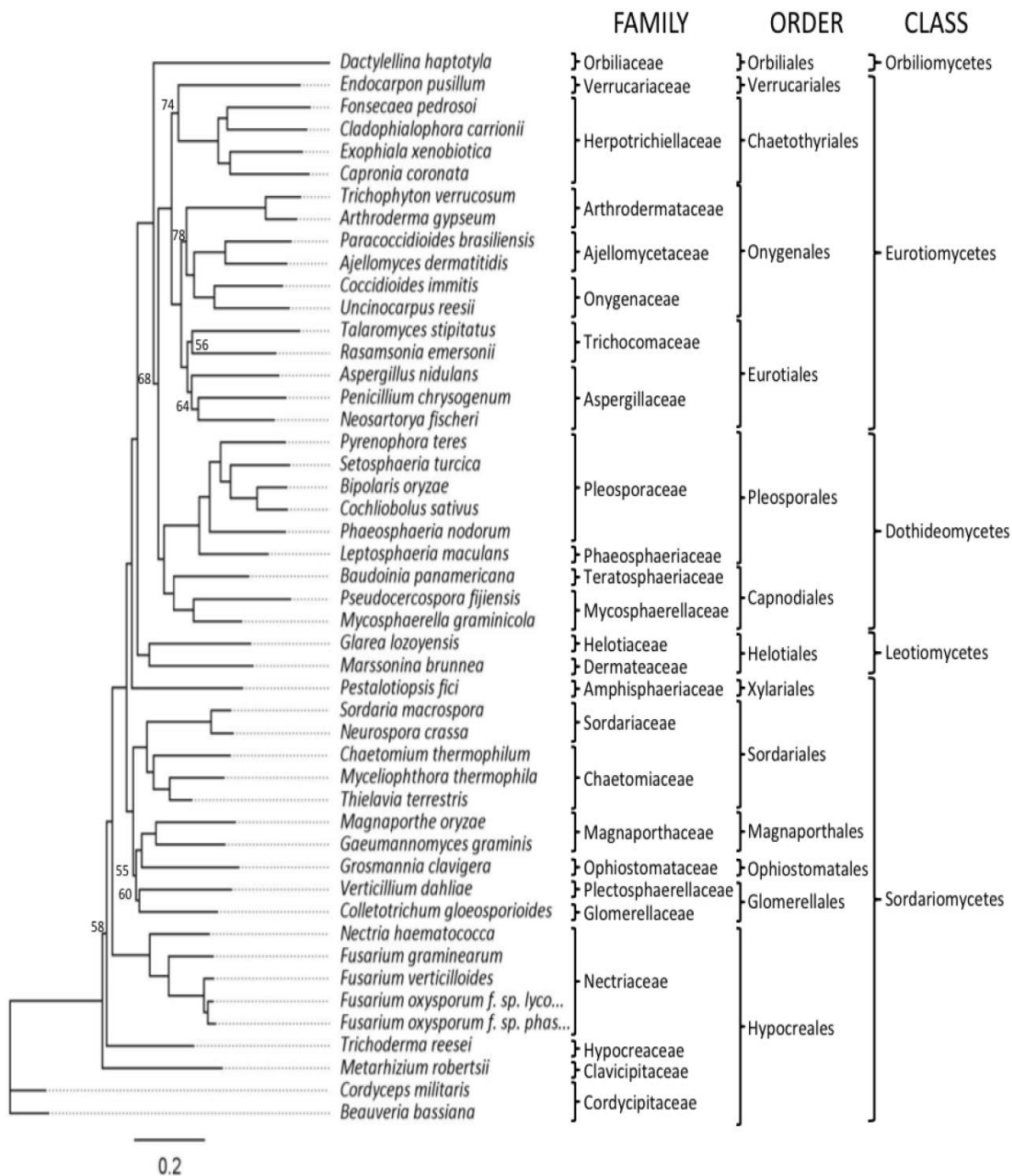


Figura 20. Similitud genética entre los homólogos de *FTF2* (*Fusarium Transcription Factor 2*) en diferentes especies de hongos. El dendrograma se obtuvo utilizando las ORFs (*Open Reading Frames*, Marcos de lectura abierta) de la secuencia única de *FTF2* encontrada en cada genoma fúngico, excepto para las de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en las que se utilizaron las secuencias de los *loci* FOXG_09390 y JN167165, respectivamente. La escala indica la longitud de cada rama que representa una sustitución por sitio. A la derecha se indican los nombres de las especies, familia, orden y clase. Los números en las ramas son valores de *bootstrap* inferiores a 80 (tomado de Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

La secuenciación de la fase de lectura abierta de *FTF2* en la forma especial *phaseoli* (Ramos, 2005) indicó que el gen consta de 3.219 pb y que dicha ORF se encuentra interrumpida por un intrón de 49 pb, intrón que se localiza en la misma posición que el intrón localizado en la secuencia de los parálogos de *FTF1*. La secuencia aminoacídica deducida para la proteína codificada presenta 1.072 aminoácidos; el alineamiento de la secuencia en la base de datos *Pfam* permitió identificar dos dominios característicos: un dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ y un dominio característico de factores de transcripción fúngicos o dominio de mediana homología (MHR, *Medium Homology Region*) (Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

La anotación disponible de la secuencia completa del genoma de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (genoma de referencia) (Ma *et al.*, 2010) permitió realizar estudios acerca de la localización cromosómica y el entorno genómico en el que se ubican diferentes *loci*. El entorno genómico en el que se localiza el *locus* FOXG_09390 (*FTF2*) difiere del que se ha descrito para los parálogos de *FTF1*. Mientras que éstos últimos se localizan en el genoma adaptativo en regiones genómicas ricas en elementos transponibles en las que abundan genes *SIX* que varían en función del parálogo de *FTF1* (van der Does *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2013); *FTF2* se localiza en el cromosoma 9 del genoma central en un entorno genómico con *loci* conservados evolutivamente en las distintas formas especiales del complejo de especies FOXC tanto en distribución en el genoma como en la función desempeñada por las proteínas que codifican. Aguas arriba del inicio de traducción de la proteína *FTF2* se localizan un gen codificante para una histona deacetilasa de la familia Sir2 y un gen codificante para una peptidasa de la familia C50 (homóloga a la proteína codificada por el gen *BimB* de *Aspergillus nidulans*); aguas abajo del codón de terminación de traducción, pero compartiendo secuencia con el terminador de *FTF2*, se encuentra el gen FOXG_09391 con una secuencia nucleotídica de 1.971 pb codificante para una proteína de la familia KRI-1 implicada en el ensamblaje de ribosomas; a 141 pb aguas abajo del final del terminador de *FTF2* se localiza otro gen pequeño, FOXG_09392, de 706 pb, codificante para una proteína GTPasa de la familia Ras (Figura 21).

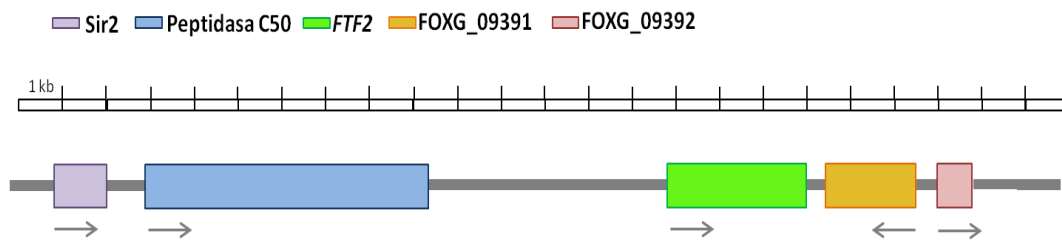


Figura 21. Localización de ORFs en el entorno genómico cercano a *FTF2* en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En color morado se resalta la ORF del locus FOXG_09388 (Sir2), en color azul la ORF del locus FOXG_09389 (Peptidasa C50), en color verde se resalta la ORF del locus FOXG_09390 (*FTF2*), en color naranja la ORF del locus FOXG_09391 y en color rosa la ORF del locus FOXG_09392. En gris se indican las regiones intergénicas. Las flechas indican la dirección de transcripción.

La región genómica en la que se ubica el *locus FTF2* descrita anteriormente se encuentra bien conservada en diversas especies del género *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*) y en *Magnaporthe grisea*, con una distribución semejante de *loci*; sin embargo esta misma región muestra menor homología en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, especies en las que los *loci* que se conservan están distribuidos de una forma diferente o incluso hay *loci* no ubicados en esta región (Figura 22) (de Vega-Bartol, 2009).

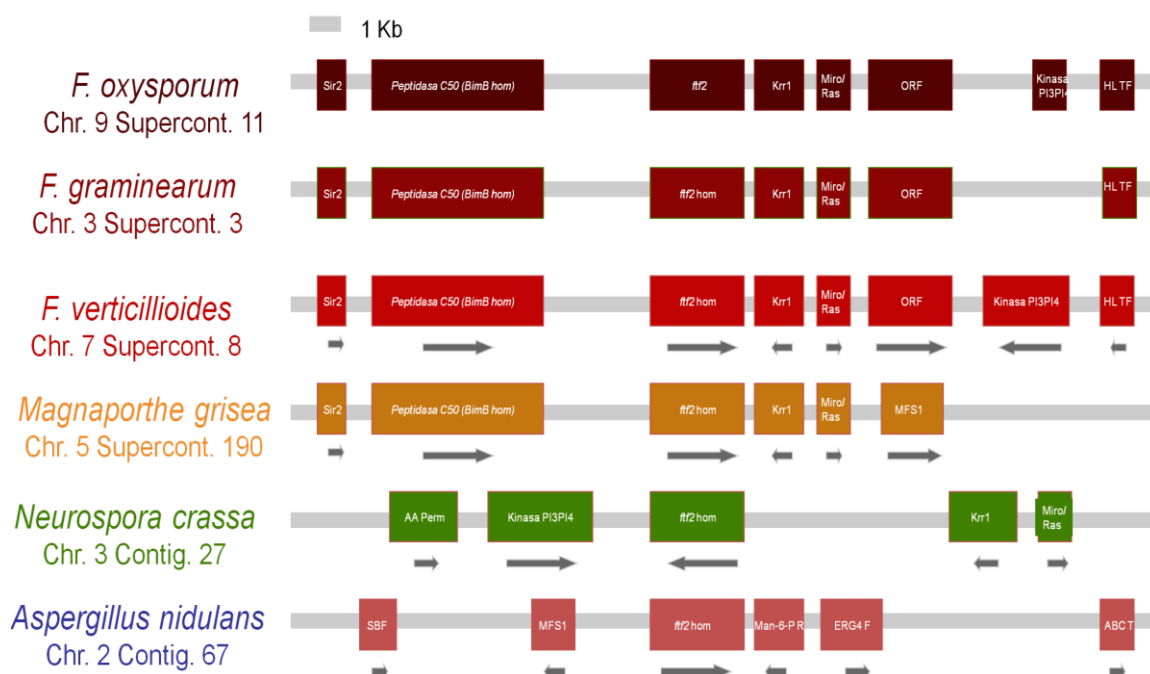


Figura 22. Alineamiento BLASTN de la región genómica donde se localiza el gen *FTF2* en diferentes especies de hongos fitopatógenos. En color se resalta la ORF de cada gen, en gris se resaltan las regiones intergénicas. Las flechas de color gris indican la dirección de transcripción (tomado de de Vega-Bartol, 2009).

Los estudios realizados hasta la fecha (Niño-Sánchez *et al.*, 2016) proponen la implicación del factor de transcripción FTF2 en la virulencia de *F. oxysporum*; sin embargo aún quedan muchos aspectos desconocidos acerca de su papel en la biología del hongo, fundamentalmente en cuanto a los genes que son regulados, directa o indirectamente, por él. Para conocer y caracterizar en detalle la posible función o funciones que la proteína codificada por el gen *FTF2* pudiera desempeñar en la biología de *F. oxysporum*, se decidió obtener mutantes deficientes en el gen y caracterizarlos funcionalmente. Para ello se diseñó una estrategia basada en el reemplazamiento génico del alelo silvestre por una copia de un alelo mutante. La región codificante de interés en este último ha sido sustituida por una fusión génica que permite la expresión del gen *hph*, codificante para una fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina en el hongo, y que queda flanqueada por regiones próximas a los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante del gen. Esta construcción de reemplazamiento fue introducida en *F. oxysporum* por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, y entre los transformantes obtenidos se identificaron aquellos en los que el alelo silvestre fue reemplazado por el mutante como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones cercanas a los extremos 5' y 3' del gen. Los mutantes obtenidos fueron caracterizados fenotípicamente en comparación con la estirpe silvestre sin transformar.

2.- RESULTADOS

El factor de transcripción FTF2: estructura tridimensional

Trabajos anteriores identificaron dos dominios funcionales en la secuencia aminoacídica deducida de la proteína FTF2: un dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ y un dominio característico de factores de transcripción fúngicos o dominio de mediana homología (MHR). Para conocer la estructura tridimensional de los mismos se llevó a cabo el modelado tridimensional utilizando el servidor de reconocimiento de proteínas *Phyre2*. De forma paralela, se realizó el modelado de los mismos dominios presentes en el factor de transcripción FTF1, homólogo a FTF2 y cuyo gen codificador pertenece a la misma familia génica que *FTF2*. Tanto en FTF2 como en FTF1, para el dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc

binuclear el servidor modeló 37 de los 38 residuos que conforman el dominio con un nivel de confianza del 99,2%; en ambos casos el modelo descrito con el que presentaron un mayor porcentaje de homología (identidad del 46%) fue el correspondiente al dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ del regulador Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 23A).

En cuanto al modelado para la secuencia deducida del dominio MHR, en el caso del factor de transcripción FTF2 el servidor modeló 83 de los 103 residuos que lo conforman con un nivel de confianza del 90,3 %; para el de FTF1 el servidor modeló 88 de los 95 residuos que lo conforman con un nivel de confianza del 86,3%. Se modeló el dominio MHR del factor de transcripción Gal4 de *S. cerevisiae*, regulador con el que el dominio dedo de zinc binuclear, tanto de FTF2 como de FTF1, mostró un porcentaje de homología más elevado; el servidor en el caso de Gal4 modeló 66 residuos de los 75 que conforman el dominio con un nivel de confianza del 33,5% (Figura 23B). El modelo tridimensional obtenido para los dominios MHR permitió identificar una región en forma de α -hélice presente en el dominio de FTF2 y ausente en los dominios de FTF1 y de Gal4 (Figura 23B). Dicha α -hélice se corresponde con una secuencia que abarca 10 aminoácidos que presenta variabilidad en tres residuos (posiciones 4, 6 y 8 de la secuencia de 10 aminoácidos) entre el dominio del factor de transcripción FTF2 y el de FTF1, y que no se encuentra presente en la secuencia aminoacídica del dominio de Gal4 (Figura 24A). La variabilidad en esos tres residuos entre FTF2 y FTF1 viene determinada por mutaciones puntuales en los nucleótidos de cada codón: la mutación en el segundo nucleótido del codón del residuo 4 determina el cambio de una treonina (FTF2) por una asparragina (FTF1); la mutación del primer y último nucleótido del codón para el residuo 6 marca el cambio de una prolina (FTF2) por una alanina (FTF1); y la mutación del segundo y tercer nucleótidos del codón del residuo 8 provoca un cambio de una lisina (FTF2) por una treonina (FTF1) (Figura 24B).

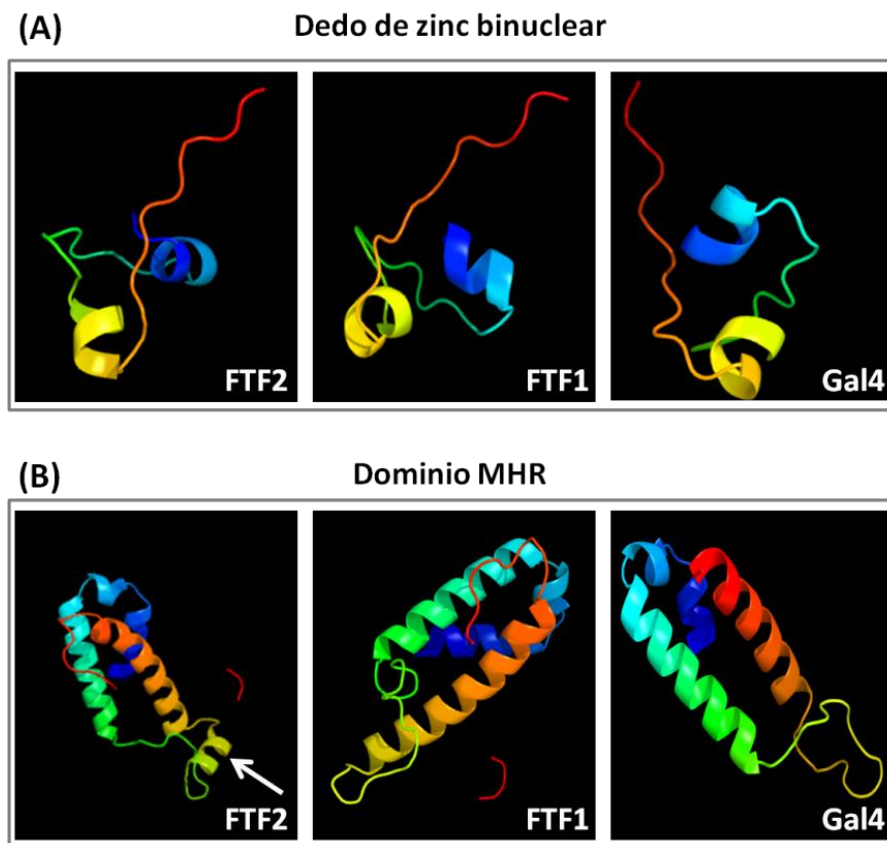


Figura 23. Modelos tridimensionales para los dominios dedo de zinc binuclear y MHR predichos por el servidor de reconocimiento de proteínas *Phyre2* para las proteínas FTF2, FTF1 y Gal4. **A**, Modelo obtenido para el dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc binuclear. **B**, Modelo obtenido para el dominio MHR. La flecha de color blanco identifica la α -hélice presente en el dominio MHR de FTF2 y ausente en el de FTF1 y el de Gal4.

FTF2:	(A)
LTILTCLLILGLHEFGTCQGGRSWALGGQAIRMAFALQLHKDLEYDP SGRTGPKQL SF	
IDREIRRRIMWACFLDRFNSSGTDRPMPFIREDTIQIPLPVKEK	
FTF1:	
SLTILTCLLILGLHEFGTCQGSRSWALSGQAIRMAFALQLHKDLGYD SGRNGAKQL LN	
FNDRETRRHILWACFPIGPLQLLLGQDSTHGSSRED	

FTF2:	(B)
TCC GGT CGT <u>ACT</u> GGT <u>CCT</u> AAA <u>AAA</u> CAG CTT	
S G R T G P K K Q L	
FTF1:	
TCC GGC CGT <u>AAT</u> GGC <u>GCC</u> AAA <u>ACG</u> CAG CTC	
S G R N G A K T Q L	

Figura 24. Secuencia aminoacídica que conforma el dominio MHR en los factores de transcripción FTF en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **A**, Secuencia aminoacídica correspondiente al dominio MHR en FTF2 (secuencia superior) y FTF1 (secuencia inferior). En color rojo se resalta la secuencia de 10 aminoácidos que determina la α -hélice presente en el dominio MHR de FTF2 y ausente en el de FTF1; se subrayan los tres residuos que muestran variabilidad en esa región entre ambos factores de transcripción. **B**, Representación de la secuencia nucleotídica (línea superior en cada caso) que codifica para la α -hélice (secuencia aminoacídica en la línea inferior en cada caso) presente en el dominio MHR de FTF2 y ausente en el de FTF1. En rojo se resaltan los aminoácidos que presentan variabilidad en la secuencia de ambos factores de transcripción; en azul y subrayados se resaltan los nucleótidos que determinan el cambio de aminoácido entre ambos factores.

Interrupción génica de *FTF2* en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Para obtener mutantes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* deficientes en la copia nativa de *FTF2*, se utilizó como base el plásmido pRF-HU2 (Frandsen *et al.*, 2008) diseñado para el reemplazamiento génico en hongos filamentosos. El plásmido porta una fusión génica con el gen *hph* (promotor *pTrpC* de *Aspergillus nidulans*, gen *hph*, y terminador *TtrpC* de *A. nidulans*), codificante para una fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina, y presenta los sitios de clonación para dos amplicones de PCR flanqueando a dicha fusión génica. En esos sitios, y de manera direccional, se

clonaron regiones próximas a los extremos 5' y 3' de la ORF correspondiente a *FTF2*. Para seleccionar dichas regiones de *FTF2* y clonarlas en el plásmido, se llevó a cabo una búsqueda en la secuencia genómica del gen depositada en la base de datos *GenBank* (código de acceso: JN167165). La peculiar distribución de genes en esta región forzó a una selección particular (Figura 25): en cuanto a la región cercana al extremo 5' se seleccionó un fragmento de 844 pb situado 842 pb aguas arriba del codón de inicio ATG; para la región próxima al extremo 3' se decidió seleccionar un fragmento de 776 pb situado en el interior de la ORF de *FTF2*, 310 pb aguas arriba del codón de terminación TAG, a fin de evitar la delección parcial del gen contiguo (locus *FOXG_09391*).

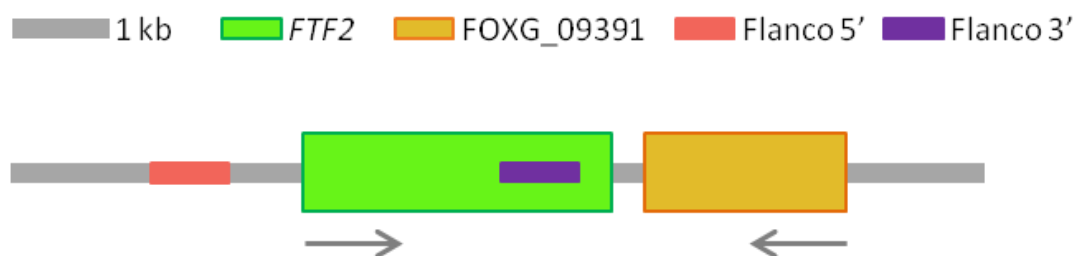


Figura 25. Esquema representativo de la localización de las regiones seleccionadas para el diseño del plásmido utilizado en la interrupción génica de *FTF2*. En color verde se resalta la ORF de *FTF2*, en color naranja se resalta la ORF del locus *FOXG_09391*. En rosa y morado se identifican las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2*, respectivamente, utilizadas para la construcción del plásmido de reemplazamiento. En gris se indican las regiones intergénicas. Las flechas indican la dirección de transcripción.

Las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* se obtuvieron mediante reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico de la estirpe poco virulenta FOP-SP4, para evitar amplificaciones derivadas de los parálogos de *FTF1* debido a la elevada homología existente con la secuencia de *FTF2*. La amplificación se llevó a cabo utilizando cebadores en cuyos extremos 5' se añadió una secuencia específica para permitir la clonación dirigida en el plásmido pRF-HU2, tal y como se detalló en el apartado 13 de Materiales y Métodos (Ligaciones: clonación *USERTM Friendly*). Para la amplificación de la región próxima al extremo 5' se utilizaron los cebadores Inac-*FTF2*-O1 e Inac-*FTF2*-O2; para la amplificación de la región cercana al extremo 3', los cebadores Inac-*FTF2*-A3 e Inac-*FTF2*-A4, todos ellos detallados en la Tabla 10 (Apéndice I).

Los productos de amplificación fueron purificados y clonados en el vector pRF-HU2, previamente digerido con las enzimas *PacI* y *Nt.BbvCI* y purificado, utilizando el sistema de clonación USER™ *Friendly* siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 13 de Materiales y Métodos. El producto de ligación se utilizó inmediatamente para transformar por choque térmico células competentes de la estirpe DH5α de *Escherichia coli* tal y como se describió en el apartado 16 de Materiales y Métodos. Se identificaron colonias portadoras del plásmido de interés realizando un escrutinio en una selección de colonias resultantes de la transformación; para ello se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar fragmentos que abarcaran desde el esqueleto del vector hasta uno de los extremos de las regiones clonadas, utilizando las parejas de cebadores RF-1/*Inac-FTF2-A4* y RF-2/*Inac-FTF2-O1* (Tabla 10, Apéndice I). Se seleccionó una colonia en la que ambas amplificaciones resultaron positivas, y se comprobó mediante una digestión con la enzima de restricción *SacII* el tamaño correcto del plásmido obtenido a partir de dicha colonia (Figura 26). El plásmido final se denominó pFTF2-KO y fue conservado en *E. coli* a -80°C tal y como se describe en el apartado 2 de Materiales y Métodos. En la Figura 26C se muestra el mapa de restricción del plásmido pFTF2-KO.

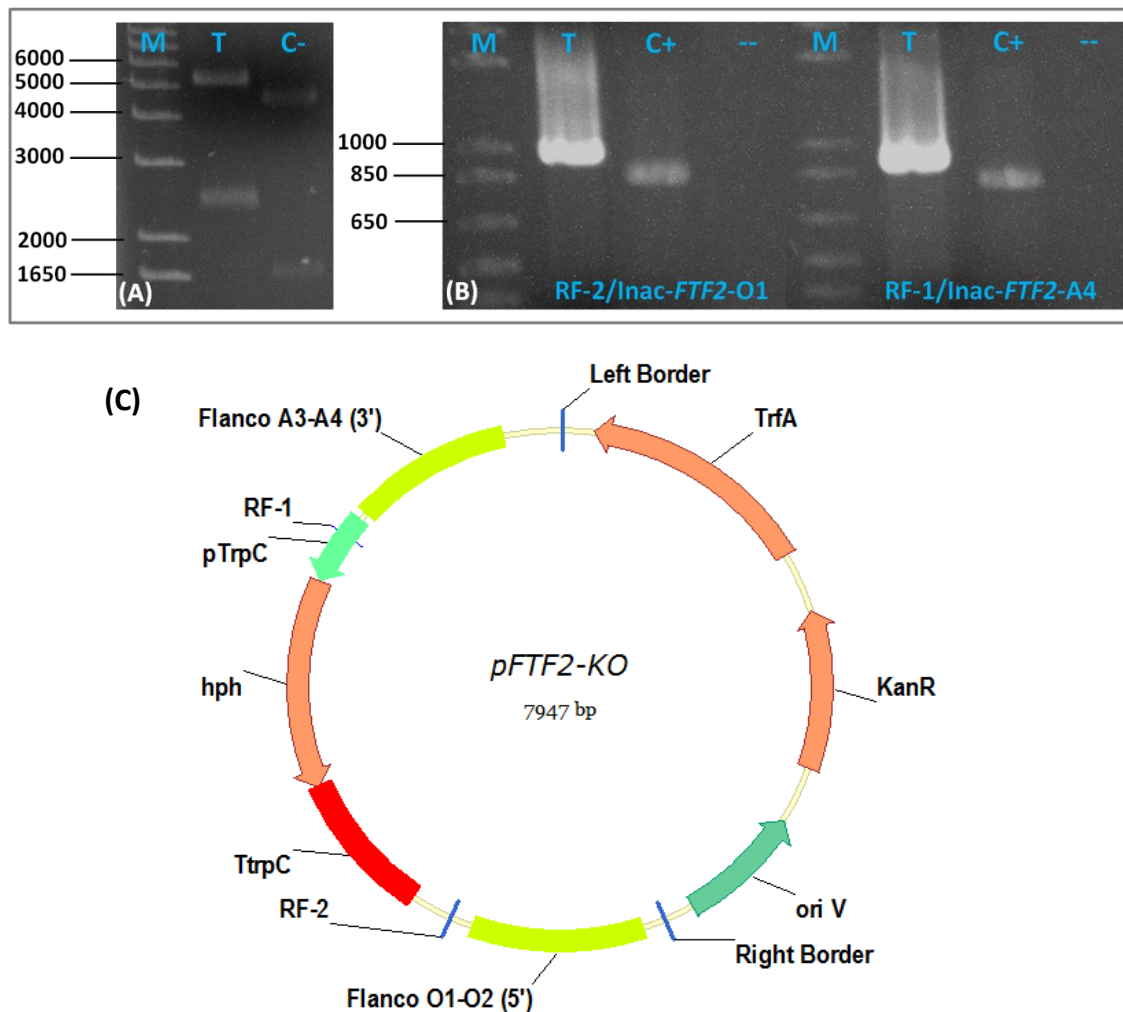


Figura 26. A-B, Análisis mediante digestión enzimática y reacciones de PCR del clon de *E. coli* transformado con el plásmido *pFTF2-KO*. Se utilizó ADN plasmídico del clon candidato como molde en reacciones de digestión con la enzima *Sac*II (A) y en reacciones de PCR (B) utilizando las parejas de cebadores RF-2/Inac-FTF2-O1 (izquierda) y RF-1/Inac-FTF2-A4 (derecha) para amplificar fragmentos de 959 y 924 pb, respectivamente. T, reacciones con ADN plasmídico procedente del clon candidato de *E. coli*; C-, reacción de digestión con ADN del plásmido pRF-HU2 utilizada como control negativo; C+, producto de PCR clonado en el vector pRF-HU2 para la obtención del plásmido *pFTF2-KO* y usado como control de tamaño; el guión azul identifica el resultado de la amplificación utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb. **C, Esquema del plásmido *pFTF2-KO* (7.947 pb) obtenido tras una clonación dirigida USER™ Friendly.** En color verde lima se destacan las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* procedentes del ADN genómico de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

El plásmido *pFTF2-KO* fue introducido en la estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* mediante electroporación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 16 de Materiales y Métodos. De igual manera que se procedió con las colonias obtenidas en la transformación de *E. coli*, una selección de colonias de *A. tumefaciens* obtenidas tras

la transformación fueron analizadas por PCR para verificar la presencia del plásmido p $FTF2$ -KO en la bacteria (Figura 27). Se seleccionó al azar una colonia portadora del plásmido para transformar las estirpes muy virulenta FOP-SP1 y poco virulenta FOP-SP4 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

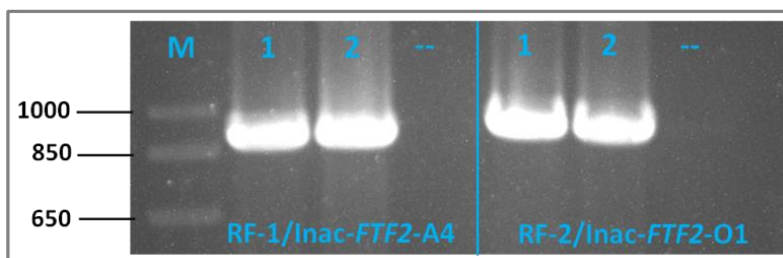


Figura 27. Análisis mediante reacciones de PCR de clones de *A. tumefaciens* transformados con el plásmido p $FTF2$ -KO. Se utilizó ADN plasmídico de los clones candidatos como molde en reacciones de PCR utilizando las parejas de cebadores RF-1/Inac- $FTF2$ -A4 (izquierda) y RF-2/Inac- $FTF2$ -O1 (derecha) para amplificar fragmentos de 924 y 959 pb, respectivamente. Los números en azul identifican a cada clon candidato de *A. tumefaciens*; el guión azul identifica el resultado de la amplificación utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb.

La transformación de las estirpes fúngicas con el plásmido p $FTF2$ -KO mediada por *A. tumefaciens* se llevó a cabo siguiendo la metodología detallada en el apartado 16 de Materiales y Métodos. Las colonias candidatas que crecieron en las placas con medio selectivo se sometieron a un escrutinio preliminar para verificar la correcta integración del alelo mutante en el genoma del hongo por un doble evento de recombinación homóloga en las regiones seleccionadas próximas a los extremos 5' y 3' de $FTF2$ (Figura 28). Se seleccionaron 48 transformantes candidatos para la estirpe FOP-SP1 y 24 para la estirpe FOP-SP4. El micelio obtenido de cada uno de ellos tras su cultivo en medio líquido se utilizó para extraer ADN genómico como se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Se utilizó este ADN como molde en reacciones de PCR para amplificar fragmentos que abarcaran desde regiones genómicas inmediatamente aguas arriba o aguas abajo de las regiones 5' y 3' seleccionadas, respectivamente, hasta el gen *hph*, identificando de esta forma los eventos de recombinación homóloga producidos en ambas regiones (Figura 28).

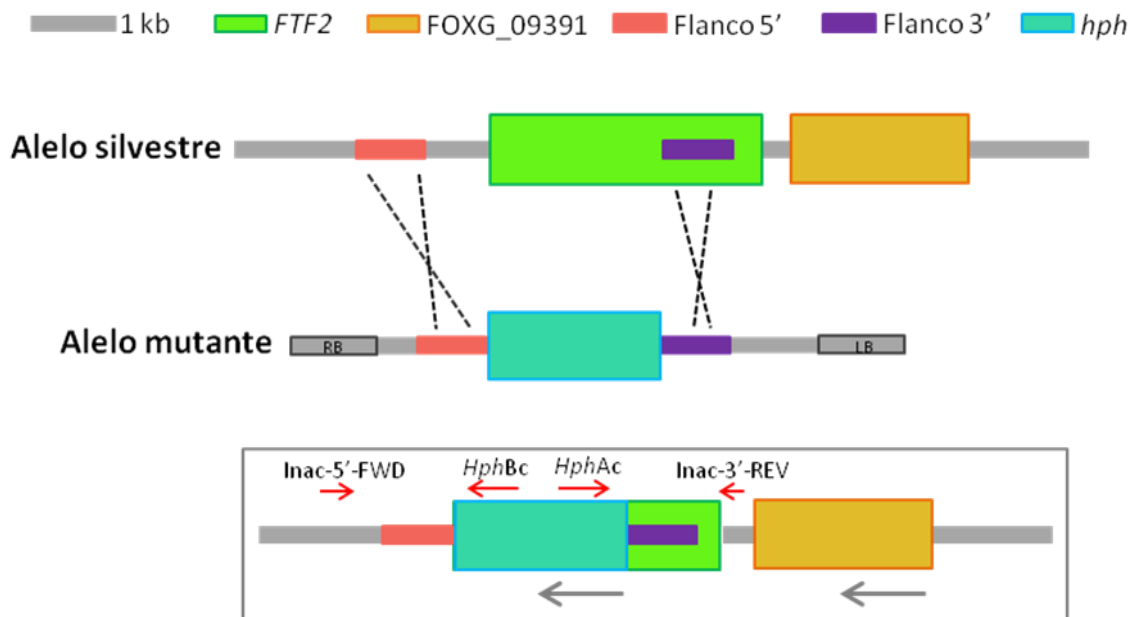


Figura 28. Estrategia de reemplazamiento génico de *FTF2* mediante un doble evento de recombinación homóloga entre las regiones cercanas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* presentes en la copia genómica del alelo silvestre del gen y las del alelo mutante. En color verde se resalta la ORF de *FTF2*, en color naranja se resalta la ORF del locus *FOXG_09391*, en color turquesa se resalta el gen *hph* flanqueado por las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* clonadas (color rosa y morado, respectivamente). En gris se indican las regiones intergénicas. Las flechas de color rojo muestran el lugar de hibridación de los cebadores con los que verificar los eventos de recombinación homóloga; las flechas de color gris indican la dirección de transcripción. En el recuadro de color gris se enmarca el alelo mutante según su disposición final en el genoma fúngico tras el doble evento de recombinación homóloga.

De esta forma se identificaron de forma rápida transformantes en los que, presumiblemente, se habían producido eventos de recombinación homóloga en ambas regiones entre el alelo silvestre del gen y el alelo mutante. Se continuó trabajando con los transformantes candidatos cuyas amplificaciones fueron positivas en ambas reacciones de PCR, 18 para la estirpe FOP-SP1 y 18 para la estirpe FOP-SP4 (Figuras 29 y 30). Los transformantes en los que no se obtuvo amplificación en ninguna de las PCRs mostraron resistencia a higromicina durante el crecimiento en medio selectivo, lo que hizo suponer una integración ectópica del alelo mutante en el genoma del hongo; estos transformantes fueron utilizados como posibles mutantes ectópicos (transformantes 7 y 27 para la estirpe FOP-SP1; transformantes 4, 12, 18 y 19 para la estirpe FOP-SP4).

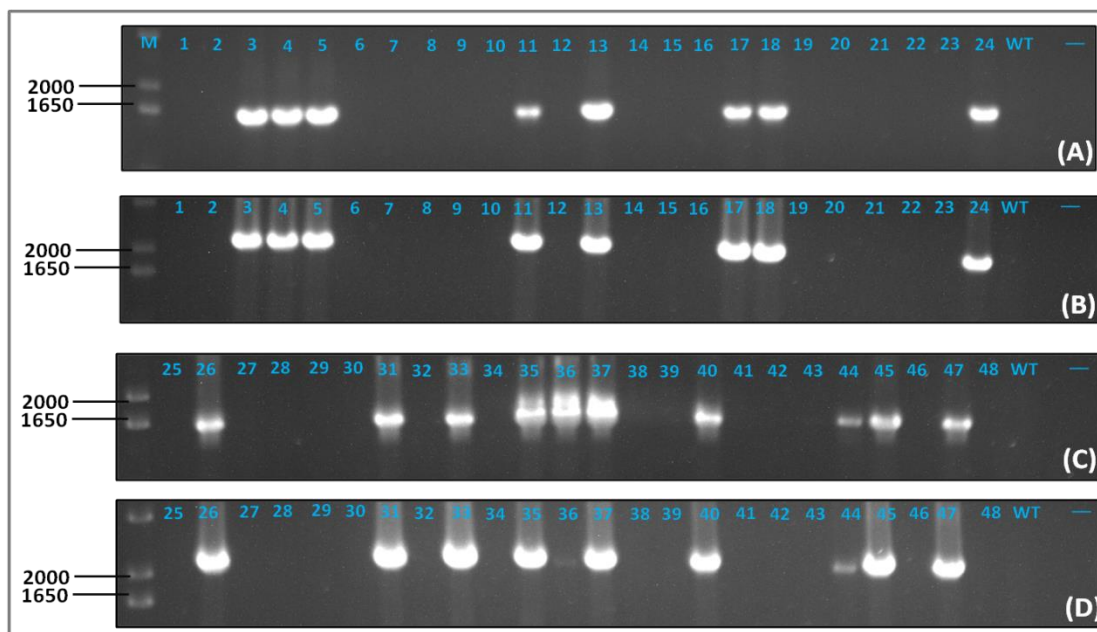


Figura 29. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes candidatos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1. Se utilizó ADN genómico de cada candidato como molde en reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 1.600 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Ac/Inactivación-3'-REV (A y C) y un fragmento de 2.100 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Bc/Inactivación-5'-FWD (B y D). Los números en azul identifican a cada transformante candidato; WT, amplificación obtenida con ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP1; el guión azul identifica el resultado de la reacción de PCR utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb.

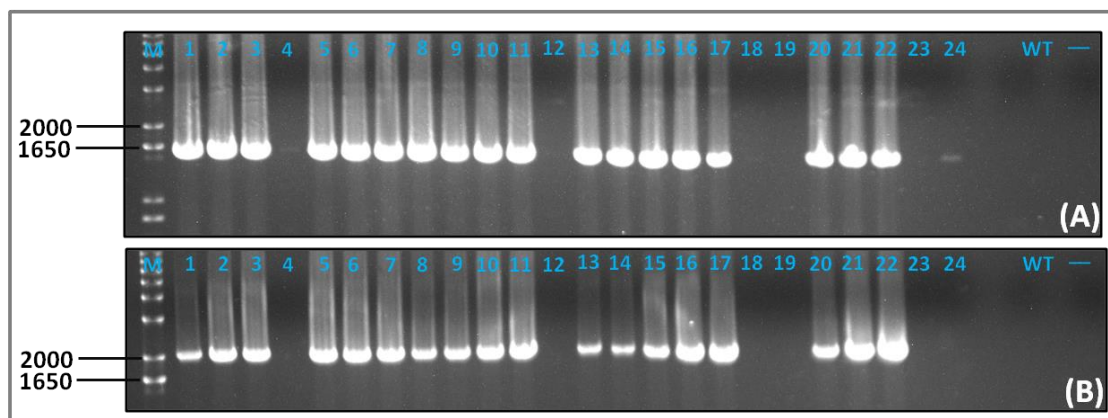


Figura 30. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes candidatos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4. Se utilizó ADN genómico de cada candidato como molde en reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 1.600 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Ac/Inactivación-3'-REV (A) y un fragmento de 2.100 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Bc/Inactivación-5'-FWD (B). Los números en azul identifican a cada transformante candidato; WT, amplificación obtenida con ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP4; el guión azul identifica el resultado de la reacción de PCR utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb.

A partir de los transformantes candidatos se obtuvieron cultivos monoconídicos que asegurasen la homocariosis del mutante. De igual manera se procedió con los transformantes con integración ectópica del alelo mutante. Se procedió según se describe en el apartado 2 de Materiales y Métodos y se permitió el crecimiento de los transformantes en medio PDA suplementado con higromicina B a una concentración de 75 µg/mL. Para la estirpe FOP-SP1 se obtuvieron cultivos monoconídicos de 13 de los 18 transformantes candidatos, y de los dos transformantes con integración ectópica; para la estirpe FOP-SP4 se obtuvieron cultivos monoconídicos de 14 de los 18 transformantes candidatos, y de los cuatro transformantes con integración ectópica. Se transfirió una pequeña porción de micelio de cada colonia crecida en medio selectivo a medio PDB y se permitió el crecimiento durante 3 días para obtener micelio y extraer ADN genómico de cada colonia tal y como se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Se utilizó el ADN como molde en reacciones de PCR para amplificar los mismos fragmentos que se amplificaron en las reacciones de PCR de comprobación preliminar de las colonias candidatas. En esta ocasión se llevaron a cabo dos reacciones más de PCR: una para verificar la presencia del gen *hph* en el genoma fúngico amplificando una región de la ORF del mismo gen con la pareja de cebadores *Hph-F/Hph-R*; otra para comprobar la ausencia de amplificación de la región delecionada del gen *FTF2* utilizando la pareja de cebadores *FTF2-FWD-SouthernInact/FTF2-REV-SouthernInact* en los transformantes de la estirpe FOP-SP1 y la pareja de cebadores *F2B6/F2M16A* en los transformantes de la estirpe FOP-SP4.

Para las colonias 11, 36 y 40 de la transformación de la estirpe FOP-SP1 se analizaron dos mutantes monoconídicos en cada caso (11.1, 11.2, 36.1, 36.2, 40.2, 40.2). En 10 de los 13 transformantes monoconídicos de la estirpe FOP-SP1 se obtuvo amplificación en las reacciones de PCR con las parejas de cebadores *Hph-Ac/Inactivación-3'-REV* (Figura 31A) y *Hph-Bc/Inactivación-5'-FWD* (Figura 31B); para los 10 se obtuvo amplificación del fragmento del gen *hph* (Figura 31C), no así del fragmento de la región delecionada del gen *FTF2* (Figura 31D). De esta forma se obtuvieron 10 mutantes interrumpidos en el gen *FTF2* para la estirpe FOP-SP1. En los transformantes con integración ectópica del alelo mutante se verificó la presencia de éste al obtenerse amplificación con la pareja de cebadores *Hph-F/Hph-R* (Figura 31C), y se comprobó que el gen *FTF2* permanecía en el genoma al obtenerse amplificación en

la reacción de PCR llevada a cabo con la pareja de cebadores *FTF2*-FWD-SouthernInact/*FTF2*-REV-SouthernInact (Figura 31D). Para los transformantes candidatos 24 y 44 se obtuvo amplificación en la reacción de PCR con los cebadores *FTF2*-FWD-SouthernInact/*FTF2*-REV-SouthernInact (Figura 31D), y en la reacción de PCR con los cebadores *Hph*-F/*Hph*-R (datos no mostrados), mientras que no se obtuvo resultado de amplificación positiva que demuestren la existencia de los dobles eventos de recombinación homóloga (Figura 31A, 31B), por lo que ambos transformantes se incluyeron en el grupo de transformantes con integración ectópica del alelo mutante.

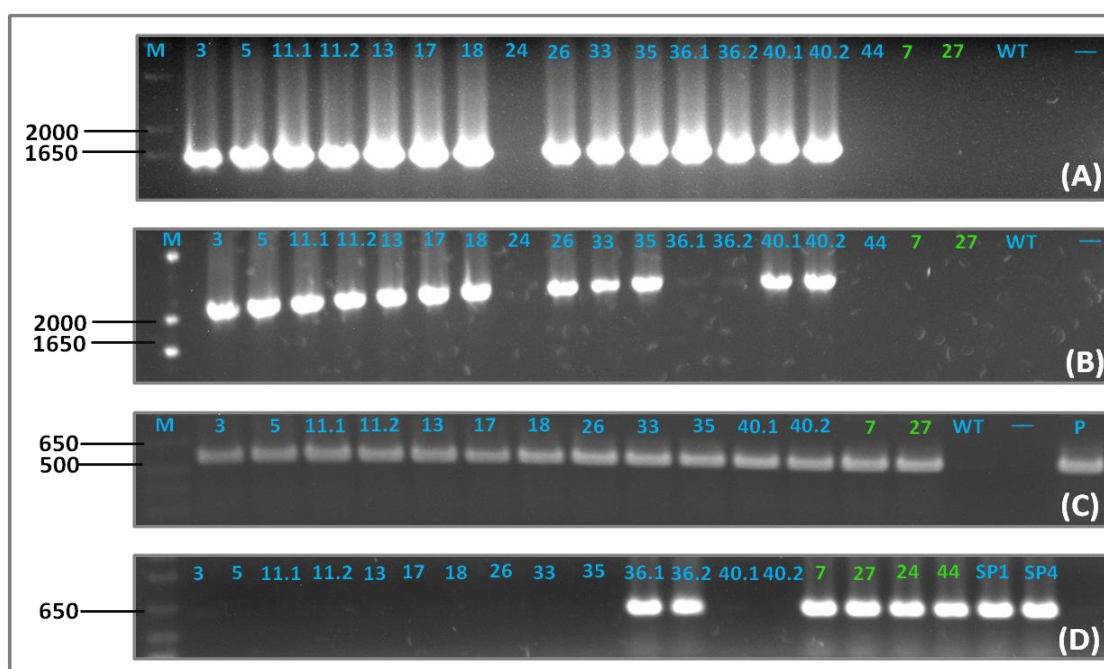


Figura 31. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes monoconídicos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1. Se utilizó ADN genómico de cada candidato como molde en reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 1.600 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Ac/Inactivación-3'-REV (A); un fragmento de 2.100 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Bc/Inactivación-5'-FWD (B); un fragmento de 549 pb localizado en la ORF del gen *hph* con la pareja de cebadores *Hph*-F/*Hph*-R (C); y un fragmento de 622 pb con la pareja de cebadores *FTF2*-FWD-SouthernInact/*FTF2*-REV-SouthernInact (D), localizado en la región codificante del gen *FTF2* presumiblemente deletada. Los números en color azul identifican a cada transformante candidato; los números en color verde identifican a cada transformante con integración ectópica del alelo mutante. WT y SP1, amplificación obtenida con ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP1; SP4, amplificación obtenida con ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP4; P, amplificación obtenida utilizando el plásmido p*FTF2*-KO como ADN molde y usada como control positivo de reacción; el guión azul identifica el resultado de la reacción de PCR utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb.

Para todos los transformantes monoconídicos obtenidos a partir de la estirpe FOP-SP4 se comprobó la existencia de los dos eventos de recombinación homóloga (amplificaciones con las parejas de cebadores *Hph*-Ac/Inactivación-3'-REV y *Hph*-Bc/Inactivación-5'-FWD) (Figuras 32A y 32B), la integración en el genoma del alelo mutante mediante la amplificación de un fragmento del gen *hph* (amplificación con la pareja de cebadores *Hph*-F/*Hph*-R) (Figura 32C) y la ausencia de la región reemplazada de *FTF2* (amplificación con la pareja de cebadores F2B6/F2M16A) (Figura 32D). En los transformantes con integración ectópica del alelo mutante se verificó la presencia de éste al obtenerse amplificación con la pareja de cebadores *Hph*-F/*Hph*-R (Figura 32C), y se comprobó que el gen *FTF2* permanecía en el genoma al obtenerse amplificación en la reacción de PCR llevada a cabo con la pareja de cebadores F2B6/F2M16A (Figura 32D).

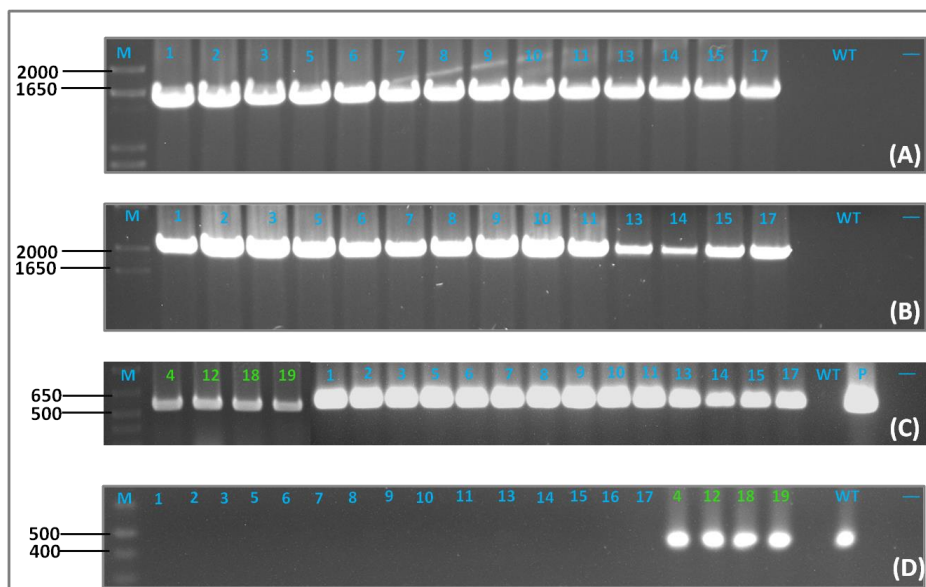


Figura 32. Análisis mediante reacciones de PCR de los transformantes monoconídicos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4. Se utilizó ADN genómico de cada candidato como molde en reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 1.600 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Ac/Inactivación-3'-REV (A); un fragmento de 2.100 pb con la pareja de cebadores *Hph*-Bc/Inactivación-5'-FWD (B); un fragmento de 549 pb localizado en la ORF del gen *hph* con la pareja de cebadores *Hph*-F/*Hph*-R (C); un fragmento de 440 pb con la pareja de cebadores F2B6/F2M16A (D) localizado en la región codificante del gen *FTF2* presumiblemente deletada. Los números en color azul identifican a cada transformante candidato; los números en color verde, a cada transformante con integración ectópica del alelo mutante. WT, amplificación obtenida con ADN de la estirpe silvestre FOP-SP4; P, amplificación obtenida utilizando el plásmido p*FTF2*-KO como ADN molde y usada como control positivo de reacción; el guión azul identifica el resultado de la reacción de PCR utilizada como control negativo sin añadir ADN molde. M, marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), tamaños en pb.

Si bien los resultados obtenidos tras las reacciones de PCR nos permiten concluir con cierta fiabilidad la correcta delección de *FTF2* en los distintos mutantes, se llevó a cabo un análisis mediante hibridación tipo *Southern blot* para tener una certeza absoluta del resultado, además de para comprobar el número de integraciones del alelo mutante en el genoma fúngico. En todo momento se siguió el procedimiento descrito en el apartado 18 de Materiales y Métodos. En primer lugar se analizaron los transformantes procedentes de la transformación de la estirpe muy virulenta FOP-SP1. Para este análisis se seleccionaron los transformantes monoconídicos 3, 5, 11.1, 11.2, 13, 17, 18, 26, 33, 35, 36.1, 36.2, 40.1, 40.2 y los transformantes ectópicos 7, 24, 27 y 44. El ADN genómico de los transformantes (desde ahora en este trabajo FOP-SP1 Δ *FTF2*-X para los transformantes deficientes en *FTF2*, y FOP-SP1Ect-X para los transformantes con integración ectópica del alelo mutante; siendo X el número de transformante) fue digerido con la enzima de restricción *Hind*III, separado mediante electroforesis en gel de agarosa y transferido a filtro de nailon. Sobre éste se llevaron a cabo hibridaciones con dos sondas diferentes, por un lado con una sonda generada a partir de la región estructural del gen *hph* (Figura 34A). En este caso, el alelo mutante se caracterizará por ser detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 8,4 kb, al deleccionarse el sitio de restricción para *Hind*III localizado en la región codificante del gen *FTF2* tras producirse los dos eventos de recombinación homóloga (Figura 33). Por otro lado, se utilizó una sonda de hibridación generada a partir de la región codificante del gen *FTF2*, correspondiente a una región con elevada homología con los parálogos de *FTF1* y situada aguas abajo del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind*III (Figura 34B). Con esta hibridación el alelo silvestre será detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 3,4 kb, mientras que el alelo mutante no será detectado al haberse deleccionado la región con la que hibrida la sonda; sin embargo, sí serán detectados los alelos silvestres correspondientes a los parálogos de *FTF1*.

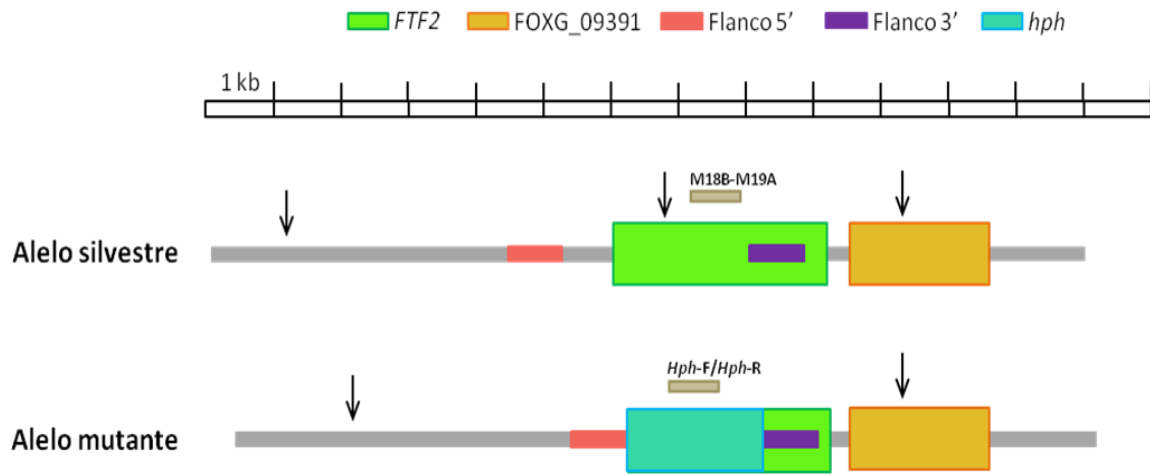


Figura 33. Localización de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *HindIII* y del lugar de hibridación de sondas en la secuencia del alelo silvestre y del mutante del gen *FTF2*. En color verde se resalta la ORF de *FTF2*, en color naranja se resalta la ORF del locus FOXG_09391, en color turquesa se resalta el gen *hph* flanqueado por las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* clonadas (color rosa y morado, respectivamente). En marrón se indica el lugar en el que hibridan las sondas utilizadas en los análisis de hibridación tipo *Southern blot*. En gris se indican las regiones intergénicas. Las flechas verticales de color negro señalan los lugares donde se encuentran las secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción *HindIII*.

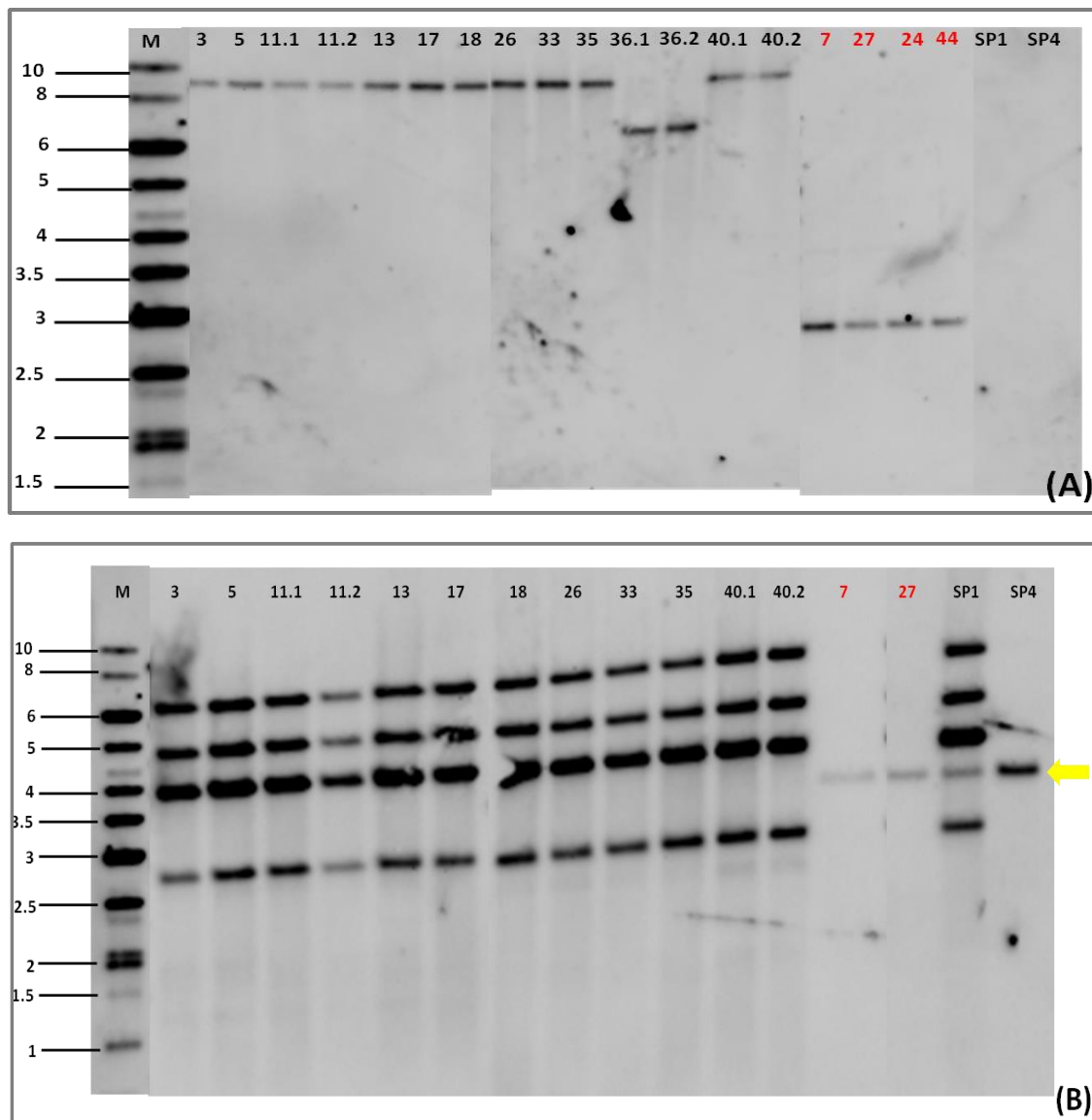


Figura 34. Análisis mediante hibridación tipo *Southern blot* de los transformantes monoconídicos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1. Las muestras de ADN genómico fueron digeridas con la enzima de restricción *Hind*III, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtro de nailon. **A**, Hibridación llevada a cabo con la sonda *Hph*-F/*Hph*-R derivada de la región estructural del gen *hph*. **B**, Hibridación realizada con la sonda M18B-M19A generada a partir de la región codificante del gen *FTF2* (la flecha amarilla muestra la localización de la señal obtenida tras la hibridación de la sonda con el alelo silvestre del gen *FTF2*). Los números sobre cada carril identifican a los transformantes (en color negro los transformantes interrumpidos en *FTF2*, en color rojo los transformantes con integración ectópica del alelo mutante); SP1 y SP4, identifican las hibridaciones realizadas sobre ADN genómico de las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4, respectivamente, utilizadas como muestras control. M, marcador de tamaño molecular (1 kb DNA ladder, Biotools), tamaños en kb.

Tras las dos hibridaciones de tipo *Southern blot* realizadas se comprobó que los transformantes FOP-SP1 Δ FTF2-3, FOP-SP1 Δ FTF2-5, FOP-SP1 Δ FTF2-11.1, FOP-SP1 Δ FTF2-11.2, FOP-SP1 Δ FTF2-13, FOP-SP1 Δ FTF2-17, FOP-SP1 Δ FTF2-18, FOP-SP1 Δ FTF2-26, FOP-SP1 Δ FTF2-33, FOP-SP1 Δ FTF2-35, FOP-SP1 Δ FTF2-40.1 y FOP-SP1 Δ FTF2-40.2 portaban el alelo mutante (todos ellos en integración única en el genoma) reemplazando el alelo silvestre del gen *FTF2* y conservando todos los parálogos del gen *FTF1*. En cuanto a los transformantes FOP-SP1 Δ FTF2-36.1 y FOP-SP1 Δ FTF2-36.2, en la hibridación con la sonda derivada del gen *hph* se observó una banda correspondiente a un fragmento de ADN de un tamaño aproximado de 6 kb, menor del esperado tras un doble evento de recombinación homóloga, por esta razón se descartaron en la siguiente hibridación.

Por su parte, los transformantes elegidos por presumiblemente portar una integración ectópica del alelo mutante (FOP-SP1Ect-7, FOP-SP1Ect-24, FOP-SP1Ect-27, FOP-SP1Ect-44), sorprendentemente mostraron los cuatro el mismo patrón de bandas de hibridación, cuando lo esperado era obtener un rango de tamaños entre los cuatro al presumir una integración completamente aleatoria: la hibridación con la sonda *Hph-F/Hph-R* reveló la existencia de una única integración de alelo mutante al observarse sólo una banda de hibridación de un tamaño aproximado de 2,9 kb; la hibridación con la sonda M18B/M19A ofreció un resultado inesperado al conservarse la banda de hibridación correspondiente al alelo silvestre del gen *FTF2* (resultados consistentes con los observados en las amplificaciones mediante reacciones de PCR de un fragmento de la región codificante del gen *FTF2* (Figura 31)), pero no existir hibridación con ninguno de los alelos silvestres de los parálogos de *FTF1* (datos no mostrados para los transformantes FOP-SP1Ect-24 y FOP-SP1Ect-44).

En segundo lugar, y de igual modo que se procedió con los transformantes con fondo genético FOP-SP1, en los transformantes obtenidos mediante transformación de la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se confirmaron los resultados obtenidos mediante PCR y se determinó el número de integraciones del alelo mutante mediante un análisis de hibridación tipo *Southern blot* siguiendo las mismas indicaciones que se detallaron anteriormente en este Capítulo. Se seleccionaron los transformantes monoconídicos 1, 2 y 7, y el transformante ectópico 4. El ADN genómico de los distintos candidatos (desde ahora en este trabajo FOP-SP4 Δ FTF2-X para los transformantes deficientes en

FTF2, y FOP-SP4Ect-X para los transformantes con integración ectópica del alelo mutante; siendo X el número de transformante) fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI (Figura 35), separado mediante electroforesis en gel de agarosa y transferido a filtro de nailon. Sobre éste se llevaron a cabo hibridaciones con tres sondas diferentes, por un lado con una sonda generada a partir de la región estructural del gen *hph*. En este caso, el alelo mutante se caracterizará por ser detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 5,7 kb. Por otro lado, se utilizaron una sonda de hibridación correspondiente a la región flanqueante 5' y otra correspondiente a la región próxima al extremo 3' de *FTF2*, utilizadas para la generación de los mutantes: con la primera hibridación el alelo silvestre será detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 2,8 kb, mientras que el alelo mutante lo será en una banda de hibridación de 1,9 kb; con la segunda hibridación el alelo silvestre se detectará en una banda de hibridación de 6,3 kb y el mutante en una de 5,7 kb (Figura 36).

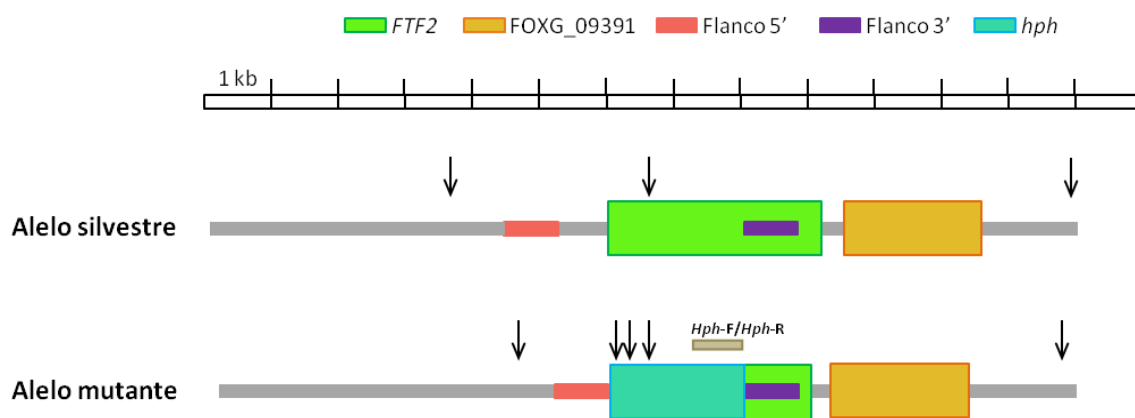


Figura 35. Localización de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI en la secuencia del alelo silvestre y el mutante del gen *FTF2*. En color verde se resalta la ORF de *FTF2*, en color naranja se resalta la ORF del locus FOXG_09391, en color turquesa se resalta el gen *hph* flanqueado por las regiones próximas a los extremos 5' y 3' de *FTF2* clonadas (color rosa y morado, respectivamente). Estas regiones fueron utilizadas también como sondas de hibridación. En marrón se indica el lugar en el que hibrida la sonda *Hph-F/Hph-R*. En gris se resaltan las regiones intergénicas. Las flechas verticales de color negro señalan los lugares donde se encuentran las secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI.

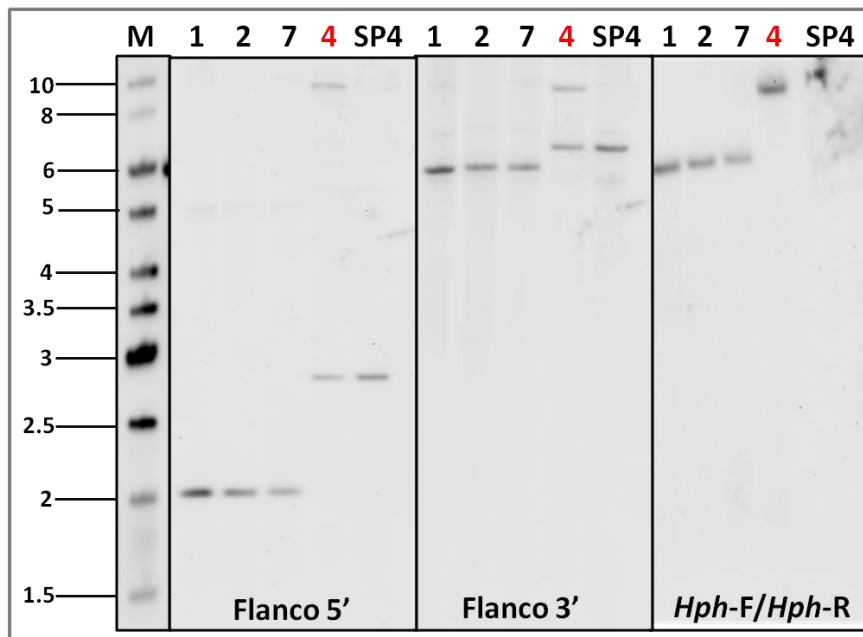


Figura 36. Análisis mediante hibridación tipo *Southern blot* de los transformantes monoconídicos de la estirpe poco virulenta FOP-SP4. Las muestras de ADN genómico fueron digeridas con la enzima de restricción *Bam*HI, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtro de nailon. Hibridación llevada a cabo con la sonda Flanco 5' (izquierda) generada con los cebadores Inac-*FTF2*-O1/Inac-*FTF2*-O2; hibridación realizada con la sonda Flanco 3' (centro) generada con los cebadores Inac-*FTF2*-A3/Inac-*FTF2*-A4; hibridación realizada con la sonda *Hph*-F/*Hph*-R (derecha) derivada de la región estructural del gen *hph*. Los números sobre cada carril identifican a los transformantes (en color negro los transformantes interrumpidos en *FTF2*, en color rojo el transformante con integración ectópica del alelo mutante); SP4, identifica las hibridaciones realizadas sobre ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP4, utilizada como muestra control. M, marcador de tamaño molecular (1 kb DNA ladder, Biotools), tamaños en kb.

Tras las tres hibridaciones de tipo *Southern blot* realizadas se comprobó que los transformantes FOP-SP4 Δ *FTF2*-1, FOP-SP4 Δ *FTF2*-2 y FOP-SP4 Δ *FTF2*-7 portaban el alelo mutante (todos ellos en integración única en el genoma) reemplazando el alelo silvestre del gen *FTF2*. Por su parte, el transformante ectópico (FOP-SP4Ect-4) portaba una única integración ectópica del alelo mutante, observándose una única banda de hibridación con todas las sondas utilizadas de aproximadamente 9 kb.

Caracterización fisiológica de mutantes interrumpidos en *FTF2* en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Se llevó a cabo una caracterización fisiológica en paralelo de los mutantes $\Delta FTF2$ obtenidos en la estirpe muy virulenta FOP-SP1 y los obtenidos en la estirpe poco virulenta FOP-SP4. Para los experimentos se seleccionaron al azar dos de los candidatos $\Delta FTF2$ de cada estirpe fúngica: FOP-SP1 $\Delta FTF2$ -17 y FOP-SP1 $\Delta FTF2$ -33 para FOP-SP1, y FOP-SP4 $\Delta FTF2$ -1 y FOP-SP4 $\Delta FTF2$ -7 para FOP-SP4. De esta forma se pretendió constatar que el fenotipo observado en los mutantes es causa de la mutación introducida y no de factores ajenos a ella.

Ante la inexistencia de evidencias que permitiesen a llevar a cabo un estudio fenotípico centrado en un campo específico, se decidió realizar un análisis fisiológico completo tanto *in vitro* (proceso de germinación, tasa de esporulación, crecimiento saprofítico) como *in vivo* (capacidad infectiva en planta huésped, respuesta defensiva de ésta durante la infección y expresión *in planta* de un grupo de genes diferencialmente expresados en el hongo en el proceso de infección).

Análisis del proceso de germinación y de la tasa de esporulación

○ Evaluación del proceso de germinación

Se evaluó el porcentaje de esporas germinadas de las estirpes FOP-SP1 $\Delta FTF2$ (FOP-SP1 $\Delta FTF2$ -17 y FOP-SP1 $\Delta FTF2$ -33) en un lapso de tiempo de 10 horas, a intervalos de 2 horas, en suspensiones de esporas en medio de cultivo PDB siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Para cada estirpe y tiempo se determinó el porcentaje de esporas germinadas de tres suspensiones de esporas independientes, utilizando como control el mismo número de suspensiones de esporas por tiempo de la estirpe silvestre FOP-SP1. Los datos comparativos de la estirpe silvestre y las estirpes mutantes para todos los tiempos evaluados se presentan en la Figura 37.

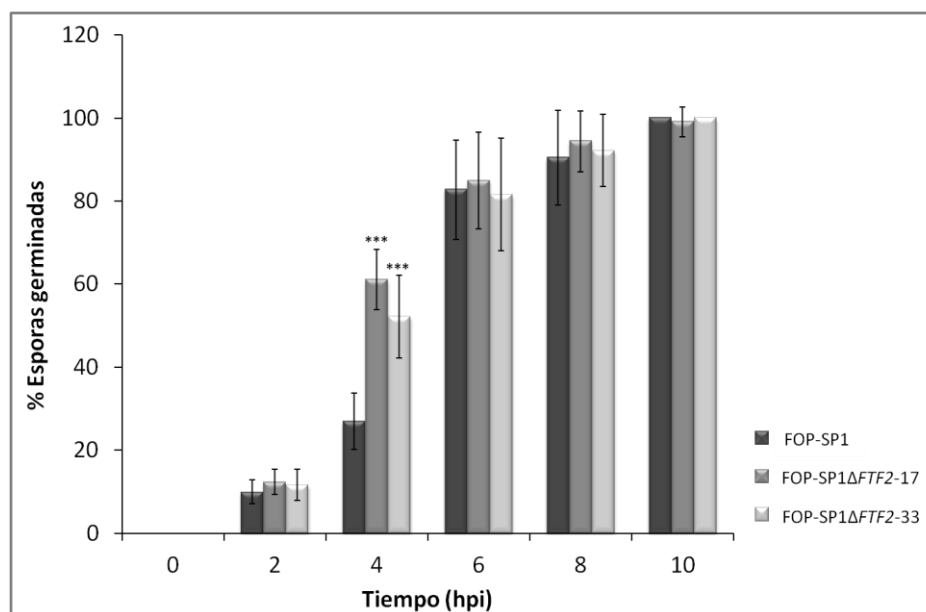


Figura 37. Tasa de germinación de estirpes FOP-SP1 Δ FTF2. El porcentaje de esporas germinadas se determinó a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 hpi para las estirpes mutantes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33 y la estirpe control FOP-SP1. Para cada estirpe se contabilizaron esporas procedentes de tres suspensiones independientes, y el experimento se repitió tres veces. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de los tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como *** ($P < 0,001$).

Las estirpes mutantes Δ FTF2 mostraron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de germinación a las 4 hpi respecto al porcentaje observado en ese tiempo para la estirpe silvestre FOP-SP1. En el resto de tiempos evaluados no se observaron diferencias en el porcentaje de germinación entre la estirpe control y las mutantes. En ninguno de los casos se observaron diferencias morfológicas entre las esporas de la estirpe silvestre y las de las estirpes mutantes (datos no mostrados).

○ Evaluación de la tasa de esporulación

Para evaluar la tasa de esporulación de las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33, se inocularon en medio líquido PDB esporas recién purificadas a una concentración de 25.000 esporas/mL en un volumen total de 40 mL; como control se inocularon esporas de la estirpe silvestre FOP-SP1 en el mismo medio, en igual concentración y volumen final de cultivo. Para analizar la tasa de esporulación de las

estirpes FOP-SP4 Δ FTF2-1 y FOP-SP4 Δ FTF2-7, se inocularon en medio líquido PDB esporas recién purificadas a una concentración de 10^6 esporas/mL en un volumen total de 40 mL; como control se inocularon esporas de la estirpe silvestre FOP-SP4 y de la estirpe FOP-SP4Ect-4 en el mismo medio, en igual concentración y volumen final de cultivo. En todos los casos, se incubaron los cultivos a una temperatura de 25°C y con agitación a 180 r.p.m. e iluminación permanente. Se mantuvieron en estas condiciones durante 10 días y se tomó una alícuota de 2 mL del cultivo a los 3, 5, 7 y 10 días para evaluar la tasa de esporulación. La alícuota del cultivo fue filtrada a través de una gasa estéril para eliminar restos de micelio presentes en el medio, y finalmente se llevó a cabo un recuento de las esporas en cámara de citometría *Thoma* al microscopio. Para cada estirpe se llevaron a cabo recuentos procedentes de cuatro cultivos independientes y el experimento se realizó por triplicado. La media de los valores de concentración de esporas de todos los recuentos realizados para cada estirpe se tomó como dato final de tasa de esporulación. En las Figuras 38 y 39 se presentan los resultados para todos los tiempos en las estirpes evaluadas.

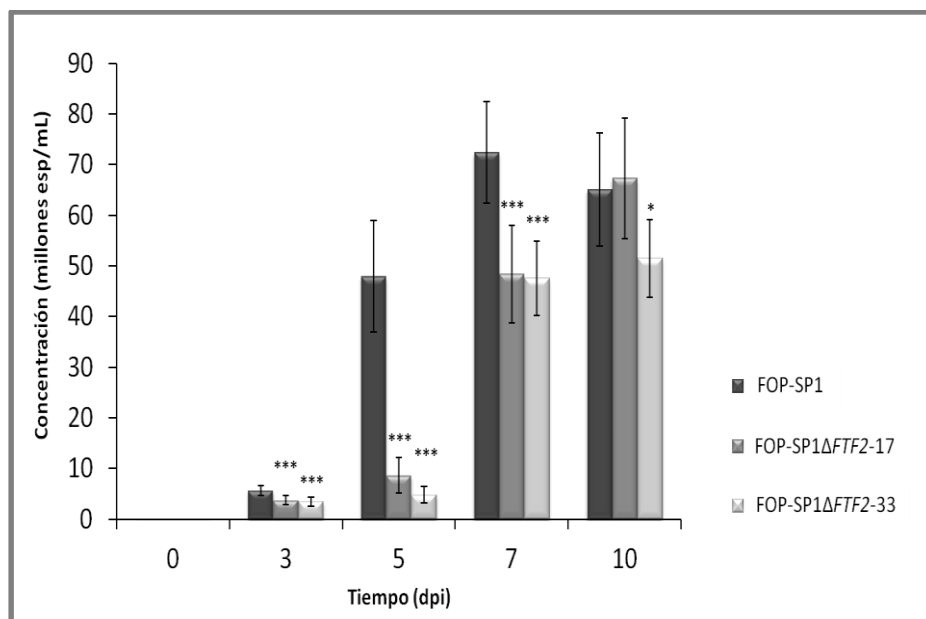


Figura 38. Tasa de esporulación de estirpes FOP-SP1 Δ FTF2. La concentración de esporas se determinó en cultivos líquidos de las estirpes mutantes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33 y la estirpe control FOP-SP1 a 0, 3, 5, 7 y 10 dpi. Para cada estirpe se contabilizaron esporas procedentes de cuatro cultivos independientes, y el experimento se repitió tres veces. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de los tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como * ($P < 0,05$) y *** ($P < 0,001$).

Para las dos estirpes FOP-SP1 Δ FTF2, el análisis estadístico demostró una reducción significativa ($P < 0,001$) en la tasa de esporulación a los 3, 5 y 7 dpi, reducción que se mantuvo de forma significativa ($P < 0,05$) a los 10 dpi para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-33. Tomando como valor de tasa de esporulación máxima para cada tiempo el dato obtenido para la estirpe silvestre FOP-SP1, a los 3 dpi existió una reducción del 34,6% y del 38,4% en la tasa de esporulación para las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33, respectivamente. La reducción fue más acusada a los 5 dpi, siendo del 81,9% para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-17 y del 89,9% para FOP-SP1 Δ FTF2-33. A los 7 dpi la reducción en la tasa de esporulación volvió a los valores observados a los 3 dpi, reducción del 33,2% y del 34,3% para FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33, respectivamente. Al término del ensayo, 10 dpi, la tasa de esporulación fue muy próxima entre los mutantes y la estirpe silvestre, observándose aún una reducción del 20,9% para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-33.

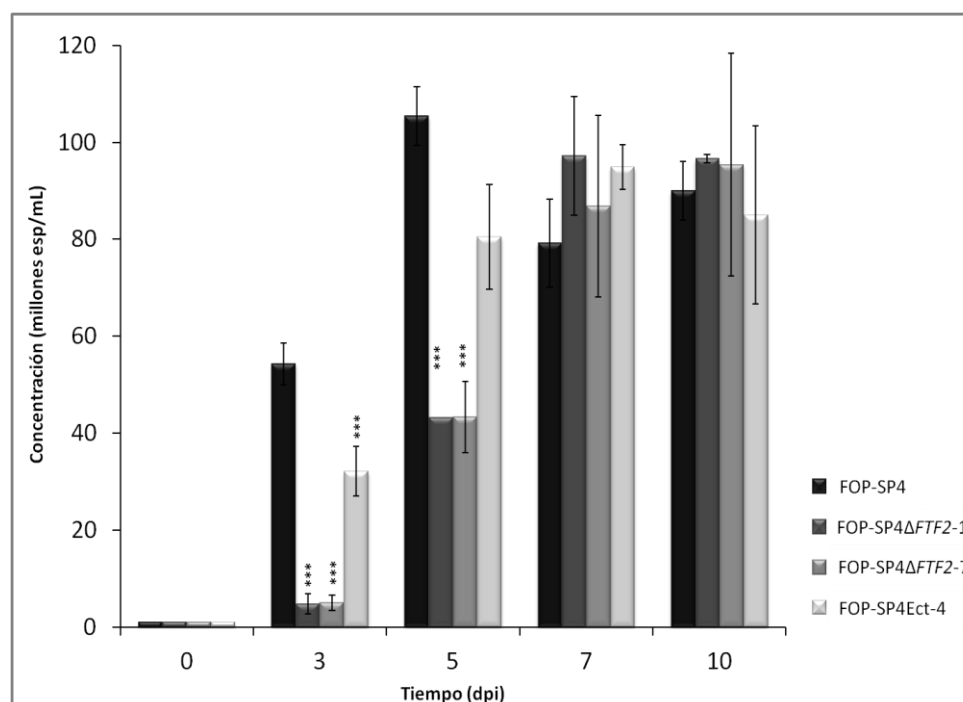


Figura 39. Tasa de esporulación de estirpes FOP-SP4 Δ FTF2. La concentración de esporas se determinó en cultivos líquidos de las estirpes mutantes FOP-SP4 Δ FTF2-1 y FOP-SP4 Δ FTF2-7 y las estirpes control FOP-SP4 y FOP-SP4Ect-4 a 0, 3, 5, 7 y 10 dpi. Para cada estirpe se contabilizaron esporas procedentes de cuatro cultivos independientes, y el experimento se repitió tres veces. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de los tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante (Δ FTF2, y Ect) y la estirpe control FOP-SP4 se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como *** ($P < 0,001$).

Para las dos estirpes FOP-SP4 Δ FTF2, el análisis estadístico demostró una reducción significativa ($P < 0,001$) en la tasa de esporulación a los 3 y 5 dpi, reducción que también fue significativa ($P < 0,001$) a los 3 dpi para la estirpe control FOP-SP4Ect-4. Tomando como valor de tasa de esporulación máxima para cada tiempo el dato obtenido para la estirpe silvestre FOP-SP4, a los 3 dpi existió una reducción del 91,1% y del 90,7% en la tasa de esporulación para las estirpes FOP-SP4 Δ FTF2-1 y FOP-SP4 Δ FTF2-7, respectivamente; para la estirpe FOP-SP4Ect-4 la reducción en la tasa de esporulación fue del 40,8%. La reducción en la tasa de esporulación a los 5 dpi fue del 59% para el mutante FOP-SP4 Δ FTF2-1 y del 58,8% para el mutante FOP-SP4 Δ FTF2-7. A los 7 y 10 dpi la tasa de esporulación fue muy próxima entre los mutantes y las estirpes control FOP-S4 y FOP-SP4Ect-4.

En ninguno de los casos, estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 o estirpes FOP-SP4 Δ FTF2, la reducción en la tasa de esporulación se debió a una alteración en la morfología o tamaño de las esporas; el estudio microscópico de las muestras en los tiempos evaluados permitió observar en todos los tiempos esporas para los mutantes iguales a las de las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4, respectivamente (Figura 40) (datos mostrados para 10 dpi).

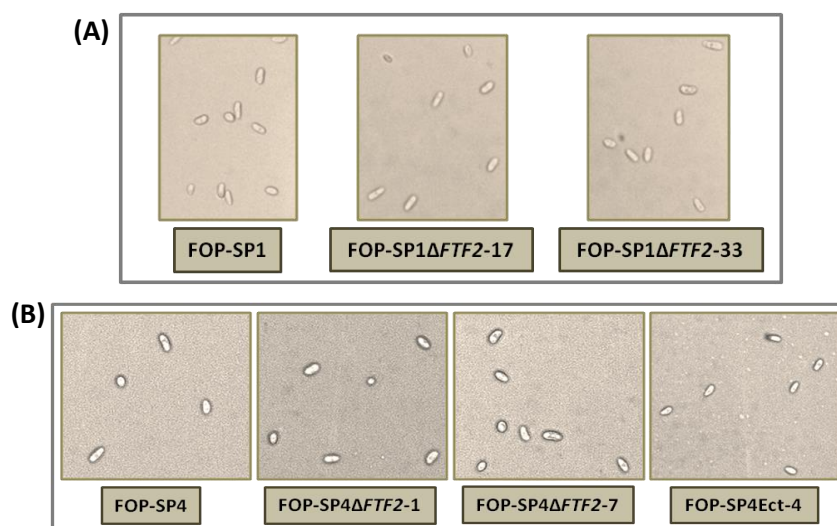


Figura 40. Microconidios de estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 y FOP-SP4 Δ FTF2 recogidos durante los ensayos de esporulación. A, Microconidios de las estirpes silvestre FOP-SP1 (izquierda) y mutantes (FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33) (centro y derecha). **B,** Microconidios de las estirpes silvestre FOP-SP4 (izquierda), estirpes mutantes Δ FTF2 (FOP-SP4 Δ FTF2-1 y FOP-SP4 Δ FTF2-7) (centro) y estirpe mutante FOP-SP4Ect-4 (derecha). En todos los casos los microconidios se recogieron de cultivos en PDB a los 10 dpi.

Análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico

La capacidad de crecimiento saprofítico de las estirpes mutantes delecionadas en *FTF2* (FOP-SP1 Δ *FTF2* y FOP-SP4 Δ *FTF2*) se analizó evaluando el crecimiento de cada estirpe en medios de cultivo sintéticos, crecimiento que fue cuantificado mediante la estimación del diámetro medio de la colonia en desarrollo sobre placas de cultivo a los 6 días tras el inóculo, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Para cada estirpe y medio de cultivo se inocularon tres placas de Petri y en todos los casos se inocularon otras tantas placas de la estirpe silvestre correspondiente (FOP-SP1, FOP-SP4) usada como control. En el caso de las estirpes con fondo genético FOP-SP4, se inocularon también el mismo número de placas para cada medio con la estirpe FOP-SP4Ect-4 utilizada como control. Para los dos grupos de estirpes (FOP-SP1 Δ *FTF2* y FOP-SP4 Δ *FTF2*) se llevaron a cabo tres repeticiones biológicas.

En primer lugar se determinó el crecimiento de las estirpes control y mutantes en medio de cultivo PDA, utilizado como medio sólido de crecimiento de rutina para hongos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 41. El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas en el crecimiento saprofítico en este medio entre cada estirpe silvestre y sus estirpes mutantes correspondientes. Las imágenes tomadas de las colonias a los 6 dpi no determinaron diferencias ni en la morfología ni en la coloración de las mismas entre las estirpes control y sus estirpes mutantes (Figura 41).

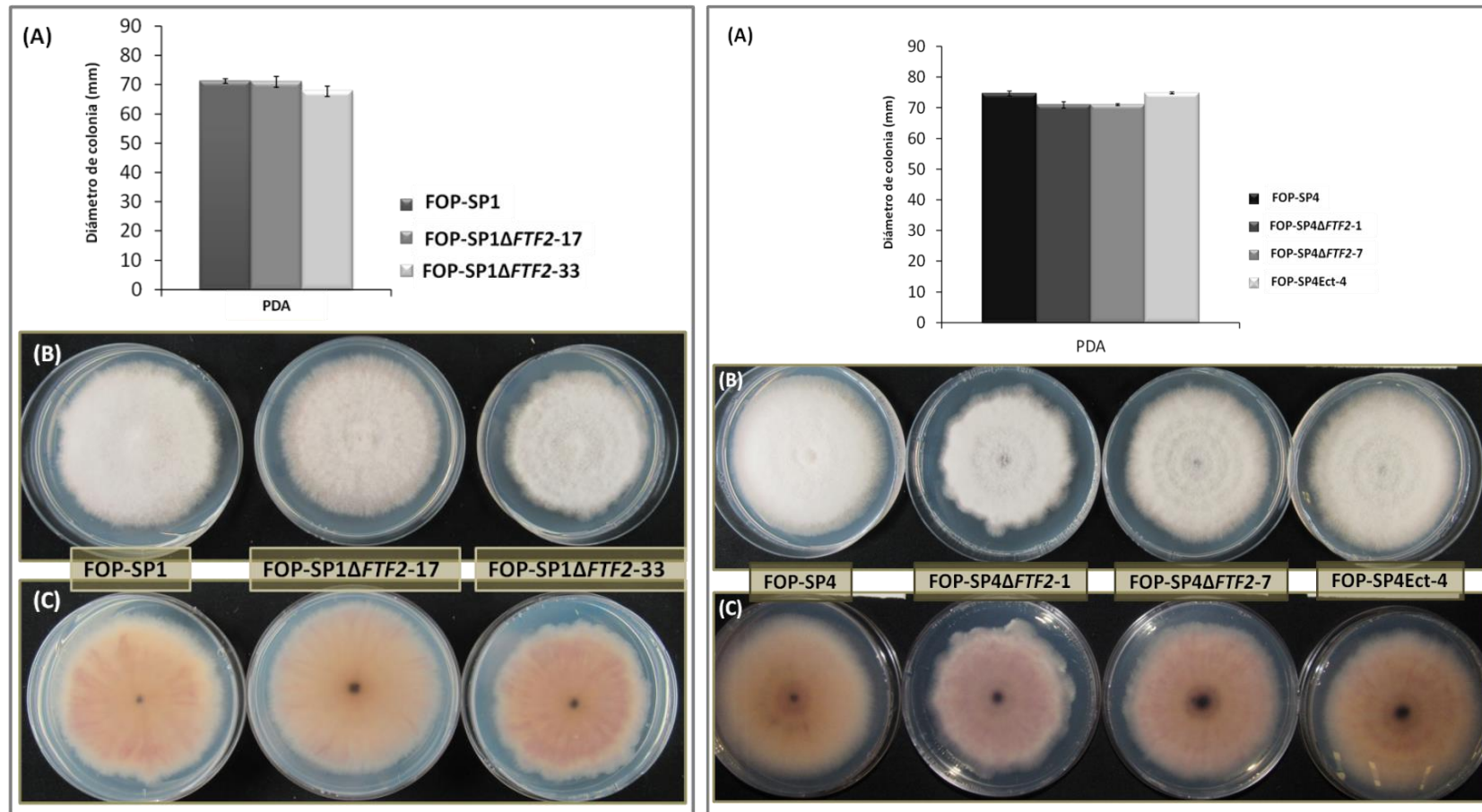


Figura 41. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 (panel izquierdo) y FOP-SP4ΔFTF2 (panel derecho) en medio PDA. **A**, Cuantificación del crecimiento radial de las colonias en desarrollo. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. **B y C**, Morfología y coloración de las colonias en desarrollo. Superficie de crecimiento (B) y cara reversa de la placa de Petri (C).

Se evaluó también la tasa de crecimiento saprofítico en medio mínimo (MM) suplementado con 23,5 mM NaNO₃ como fuente de nitrógeno en el que se fue variando la fuente de carbono (sacarosa, glucosa, manosa, xilosa, glicerol). Se analizó el crecimiento en medios con la fuente de carbono a una concentración estándar de 3% (Correll *et al.*, 1987) y, de forma paralela, en medios con la fuente de carbono a una concentración reducida al 0,3%. Los resultados obtenidos para uno y otro caso se presentan en las Figuras 42 y 43.

Para el grupo de mutantes FOP-SP1 Δ FTF2, el análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas en el crecimiento saprofítico en ninguno de los medios analizados entre la estirpe silvestre y las estirpes mutantes, excepto en medio mínimo con manosa 3% para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-33 ($P < 0,05$), en medio mínimo con glucosa 0,3% para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-17 ($P < 0,05$) y en medio mínimo con xilosa 0,3% para FOP-SP1 Δ FTF2-33 ($P < 0,05$).

Para el grupo de mutantes FOP-SP4 Δ FTF2, no se evaluó la capacidad de crecimiento saprofítico en MM suplementado con glucosa en ninguna de las dos concentraciones. En estas estirpes el análisis estadístico ANOVA realizado determinó la existencia de diferencias significativas en el crecimiento para la estirpe FOP-SP4 Δ FTF2-7 en medio mínimo con manosa 3% ($P < 0,001$) y manosa 0,3% ($P < 0,01$), y en medio mínimo con xilosa 3% ($P < 0,05$) y xilosa 0,3% ($P < 0,001$); también mostró diferencias significativas en el crecimiento para la estirpe FOP-SP4Ect-4 en medio mínimo con manosa 3% ($P < 0,01$). Para el resto de condiciones ensayadas no existieron diferencias significativas en el crecimiento entre las estirpes mutantes y la silvestre.

Las imágenes tomadas de las colonias a los 6 dpi no indicaron la existencia de diferencias ni en la morfología ni en la coloración de las mismas entre cada estirpe silvestre y sus estirpes mutantes correspondientes en ninguno de los medios evaluados (datos no mostrados para glicerol en las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2).

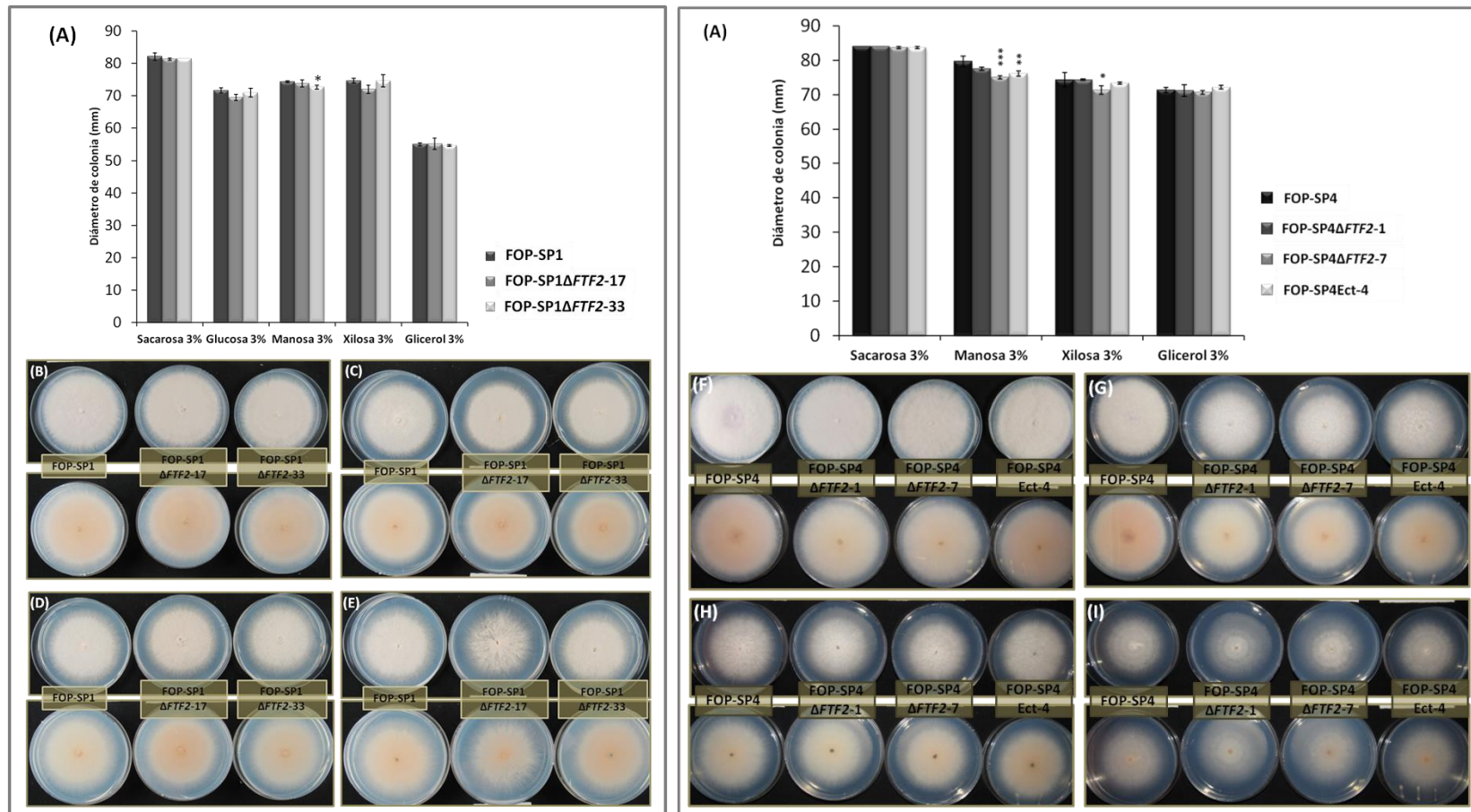


Figura 42. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 (panel izquierdo) y FOP-SP4ΔFTF2 (panel derecho) en medio mínimo con fuente de carbono al 3%. A, Cuantificación del crecimiento radial de las colonias en desarrollo. Las barras muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y su estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y * ($P < 0,001$). B-I, Morfología y coloración de las colonias en desarrollo en medio suplementado con sacarosa (B, F), glucosa (C), manosa (D, G), xilosa (E, H) y glicerol (I). Superficie de crecimiento (paneles superiores) y cara reversa de la placa de Petri (paneles inferiores).**

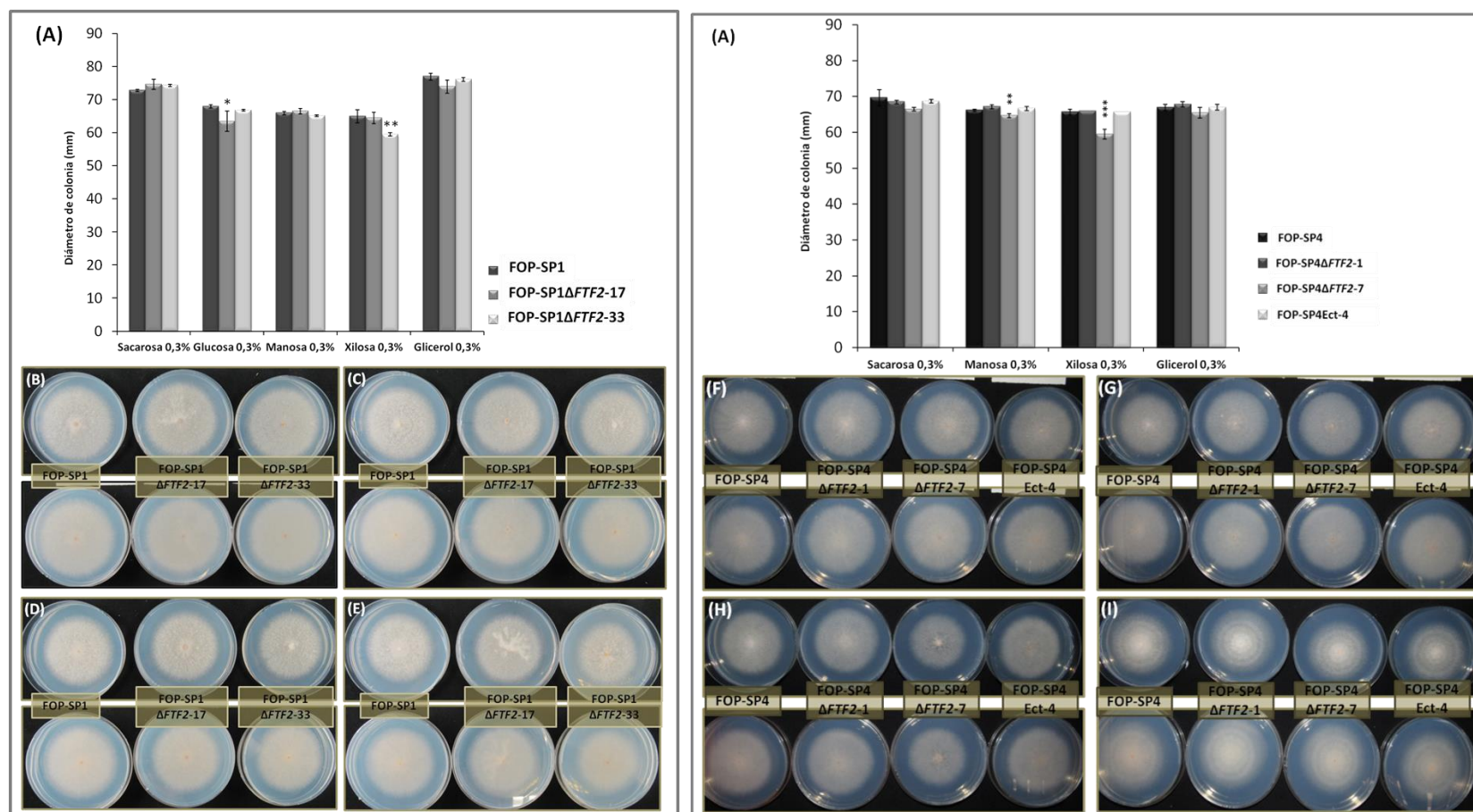


Figura 43. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 (panel izquierdo) y FOP-SP4ΔFTF2 (panel derecho) en medio mínimo con fuente de carbono al 0,3%. A, Cuantificación del crecimiento radial de las colonias en desarrollo. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y su estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$). **B-I,** Morfología y coloración de las colonias en desarrollo en medio suplementado con sacarosa (B, F), glucosa (C), manosa (D, G), xilosa (E, H) y glicerol (I). Superficie de crecimiento (paneles superiores) y cara reversa de la placa de Petri (paneles inferiores).

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de la capacidad de crecimiento saprofito en medio mínimo suplementado con tres fuentes de nitrógeno diferentes (NaNO_2 , tartrato de amonio, NH_4NO_3), en todos los casos utilizando como fuente de carbono sacarosa al 3%. En la Figura 44 se presentan los datos con la estimación del crecimiento radial de las colonias en los medios indicados.

Para el grupo de mutantes FOP-SP1 ΔFTF2 , el análisis estadístico ANOVA indicó que no existen diferencias significativas en el crecimiento saprofito en ninguno de estos tres medios entre la estirpe silvestre y las mutantes. Para el grupo de mutantes FOP-SP4 ΔFTF2 , se observó una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento saprofito en medio mínimo con tartrato de amonio en la estirpe FOP-SP4 $\Delta\text{FTF2-7}$ respecto al crecimiento de la estirpe silvestre FOP-SP4 ($P < 0,001$); en el resto de condiciones no se observaron diferencias significativas.

Para ambos grupos de estirpes mutantes ΔFTF2 , la morfología y la coloración de las colonias observadas no presentaron diferencias macroscópicas respecto a sus correspondientes estirpes silvestres en los medios suplementados con NaNO_2 o NH_4NO_3 como fuentes de nitrógeno; durante el crecimiento en medio suplementado con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno se observaron colonias con un aspecto menos denso, más algodonoso y de coloración ligeramente menos intensa hacia el rojo-morado en los mutantes ΔFTF2 que en las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4.

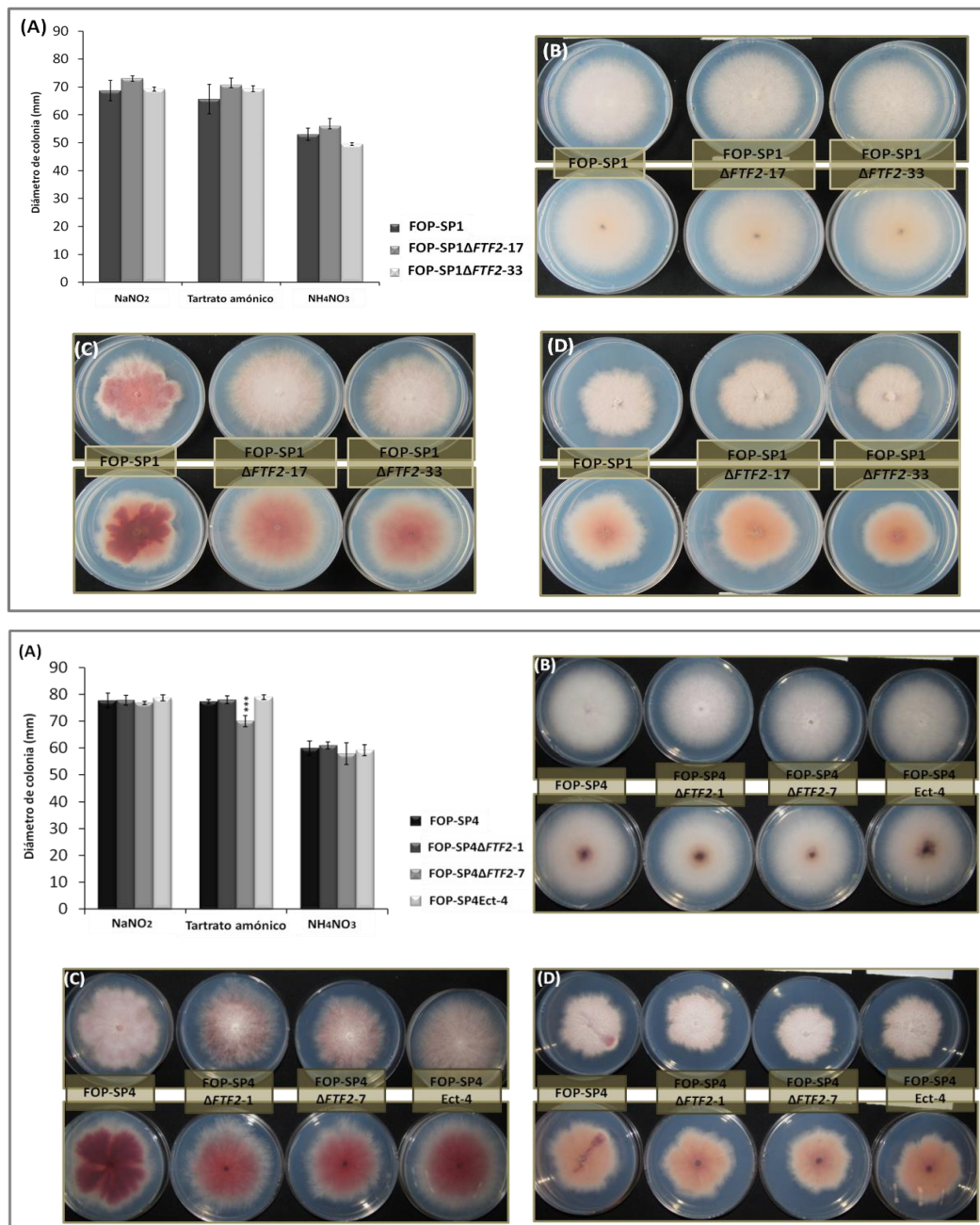


Figura 44. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 (panel superior) y FOP-SP4ΔFTF2 (panel inferior) en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno. A, Cuantificación del crecimiento radial de las colonias en desarrollo. Las barras muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y su estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como * ($P < 0,001$). B-D, Morfología y coloración de las colonias en desarrollo en medio suplementado con NaNO₂ (B), tartrato de amonio (C) y NH₄NO₃ (D). Superficie de crecimiento (paneles superiores) y cara reversa de la placa de Petri (paneles inferiores).**

Finalmente se analizó la capacidad de crecimiento saprofito en medio mínimo suplementado con sacarosa al 3% como fuente de carbono y NaNO_3 como fuente de nitrógeno que fue ajustado a tres valores de pH diferentes: 4, 6 y 8. En la Figura 45 se presentan los datos con el resultado de la estimación del crecimiento radial de las colonias en estos medios. El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas en el crecimiento saprofito en ninguno de estos tres medios entre la estirpe silvestre y las mutantes FOP-SP1 Δ FTF2, excepto en medio a pH 6 para el mutante FOP-SP1 Δ FTF2-17 ($P < 0,05$). Tampoco existieron diferencias significativas entre el crecimiento de las estirpes mutantes FOP-SP4 Δ FTF2 y la estirpe silvestre FOP-SP4; sin embargo se observó un crecimiento significativamente menor en la estirpe FOP-SP4Ect-4 respecto al crecimiento de FOP-SP4 en medio a pH 8 ($P < 0,01$). En ninguno de los casos se observaron diferencias en la morfología o la coloración de las colonias en los medios de cultivo utilizados.

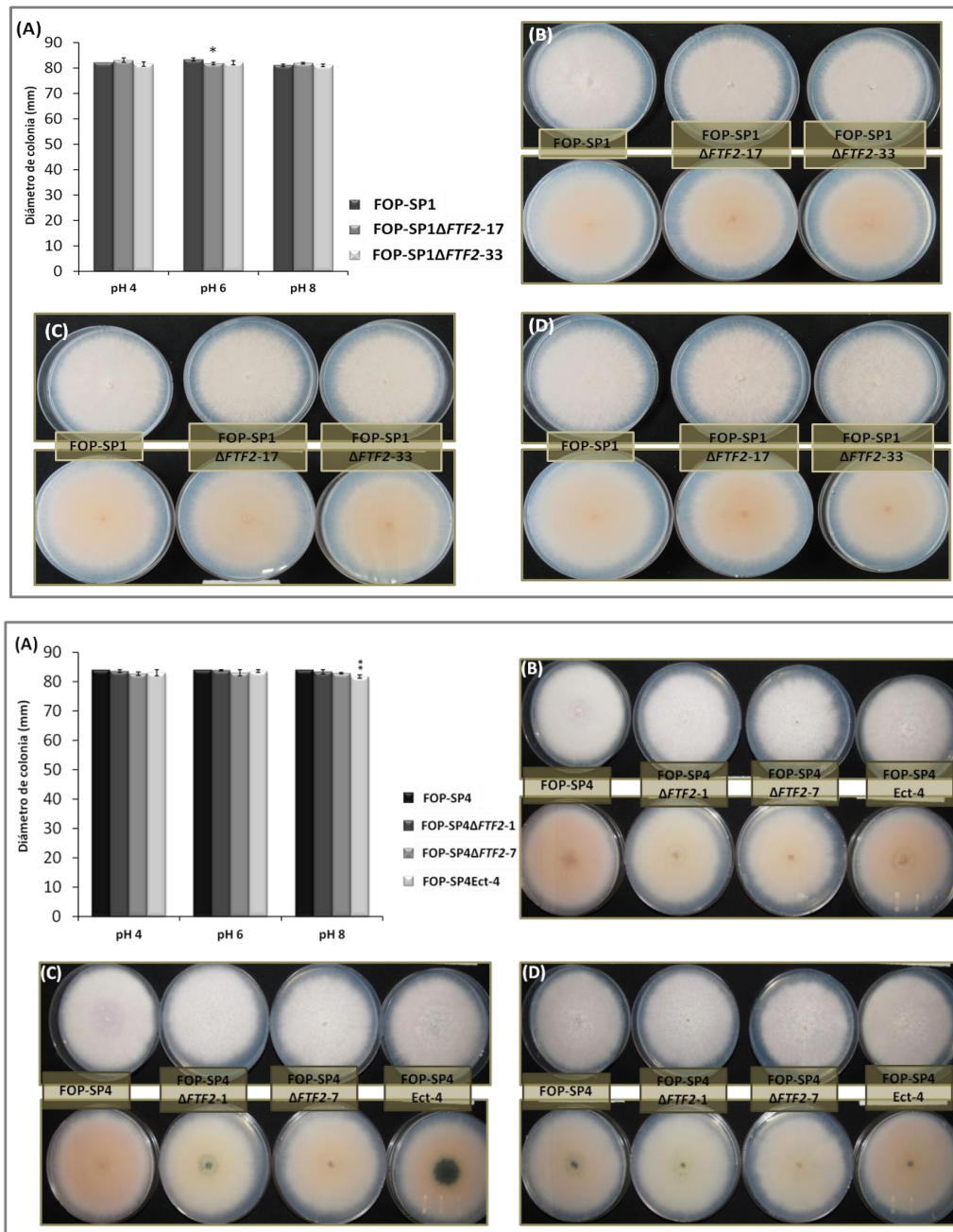


Figura 45. Crecimiento saprofítico a los 6 dpi de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 (panel superior) y FOP-SP4ΔFTF2 (panel inferior) en medio mínimo ajustado a diferentes pH. A, Cuantificación del crecimiento radial de las colonias en desarrollo. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada transformante y su estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como * ($P < 0,05$) y * ($P < 0,001$). B-D, Morfología y coloración de las colonias en desarrollo en medio a pH 4 (B), pH 6 (C) y pH 8 (D). Superficie de crecimiento (paneles superiores) y cara reversa de la placa de Petri (paneles inferiores).**

Evaluación del tipo de esporas producidas durante el crecimiento saprofítico

Al término de los ensayos para la evaluación de la capacidad de crecimiento saprofítico, se recogieron esporas de cada medio para cada estirpe y se llevó a cabo un estudio microscópico. En todos los medios analizados el tipo silvestre produjo esporas de tipo microconidio; sin embargo, los mutantes $\Delta FTF2$ en algunos medios produjeron esporas de tipo macroconidio en un porcentaje aparentemente elevado.

Se ha descrito la formación de esporas de tipo macroconidio en *F. oxysporum* sobre la planta huésped cuando ésta ya está muerta (Leslie y Summerell, 2006). En este trabajo se observó la producción de este tipo de esporas en medios sintéticos (Figura 46), por lo que se decidió llevar a cabo una cuantificación de los macroconidios producidos con el objetivo de determinar si las diferencias observadas en el microscopio eran estadísticamente significativas. El recuento sólo se llevó a cabo en el grupo de estirpes FOP-SP1 $\Delta FTF2$. Para el recuento se recogieron en agua esporas de las placas utilizadas en cada ensayo biológico, se tomaron 4-5 fotografías en el microscopio óptico de cada suspensión de esporas y sobre ellas se estimó el porcentaje de macroconidios contabilizando las esporas de tipo macroconidio sobre el total de esporas de cada muestra. La cuantificación se llevó a cabo en los medios en los que se habían observado macroconidios en un análisis preliminar: PDA, MM con sacarosa 0,3%, MM con glucosa 3%, MM con glucosa 0,3%, MM con manosa 0,3%, MM con xilosa 3%, MM con xilosa 0,3%, MM con glicerol 3%, y MM con glicerol 0,3%. En la Figura 47 se presentan los datos con la cuantificación de macroconidios producidos durante el crecimiento saprofítico. El incremento en el porcentaje de macroconidios observado en las estirpes mutantes respecto a la estirpe silvestre fue significativo en todos los medios analizados según el análisis estadístico ANOVA realizado.

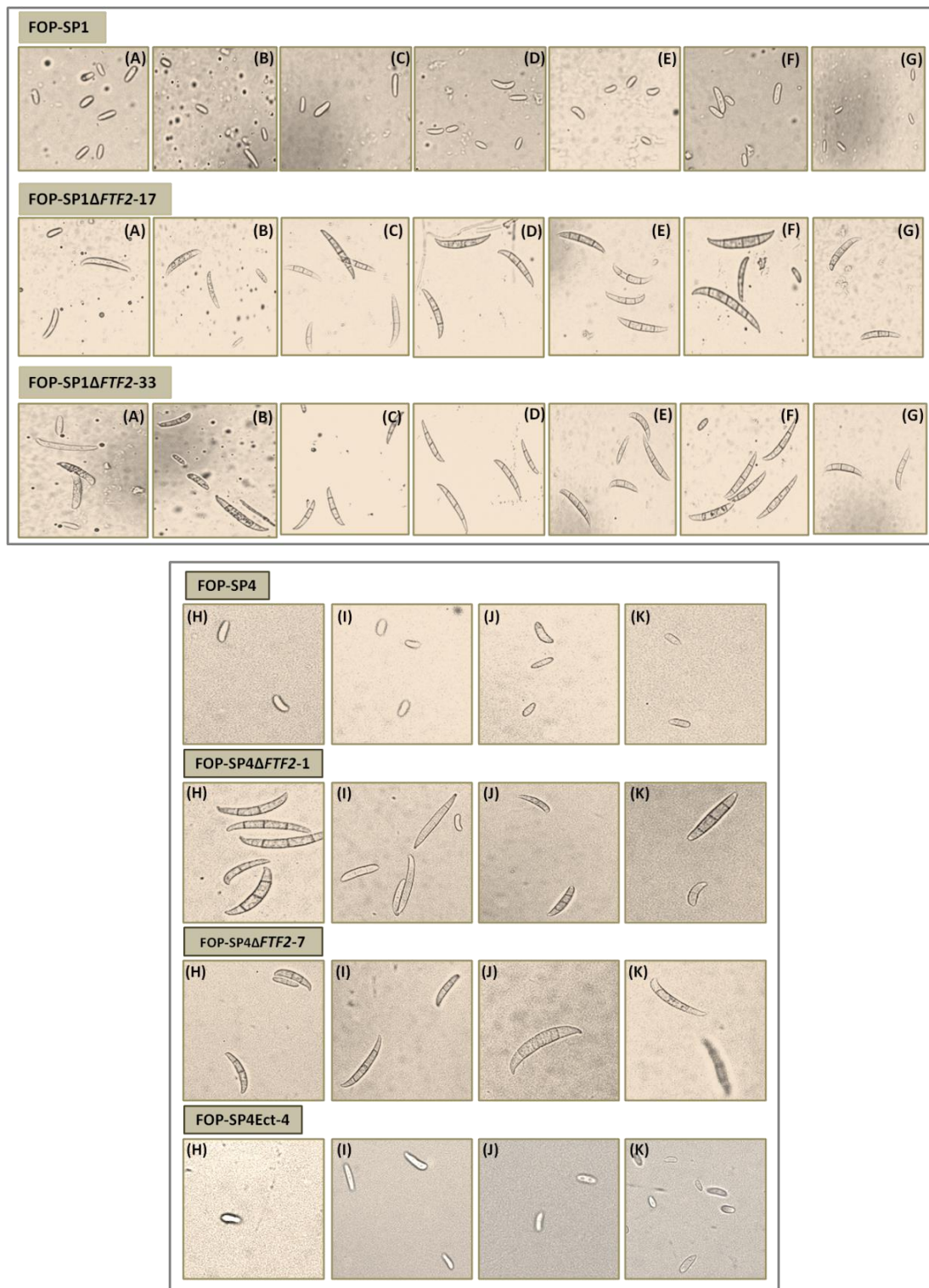


Figura 46. Formación de esporas de tipo macroconidio por las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 (panel superior) y FOP-SP4 Δ FTF2 (panel inferior) durante el crecimiento saprofítico en medio sólido. Morfología de las esporas al término de los ensayos de crecimiento saprofítico para las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4, y sus correspondientes estirpes mutantes Δ FTF2, recogidas de placas con medio PDA (A), MM glucosa 3% (B), MM glucosa 0,3% (C, I), MM sacarosa 0,3% (D, H), MM xilosa 0,3% (E, J), MM manosa 0,3% (F, K), MM glicerol 0,3% (G).

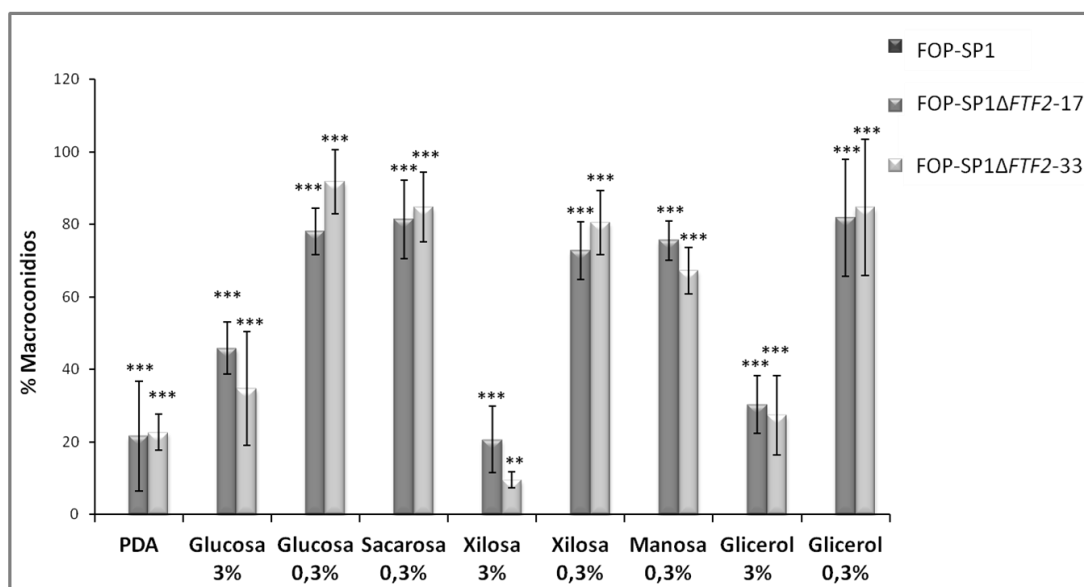


Figura 47. Formación de esporas de tipo macroconidio por las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 durante el crecimiento saprofítico en medio sólido. Cuantificación de la formación de macroconidios durante el crecimiento saprofítico mediante estimación del porcentaje de este tipo de esporas respecto al total de esporas formadas a los 6 dpi. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada estirpe transformante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$).

Evaluación de la hidrofobicidad del micelio en desarrollo durante el crecimiento saprofítico

De forma complementaria a la caracterización fenotípica realizada durante el crecimiento saprofítico de los mutantes $\Delta FT F 2$, nos propusimos conocer las características de hidrofobicidad del micelio de cada estirpe durante su crecimiento en medios sintéticos. Para ello se evaluó el comportamiento del micelio en desarrollo en dichos medios frente a una solución detergente y frente a agua. Se llevó a cabo un análisis preliminar comparando el comportamiento de las estirpes FOP-SP1ΔFTF2 y su estirpe silvestre FOP-SP1 frente a ambas soluciones. Para ello se depositaron gotas de 10 μ L con agua destilada y gotas de 10 μ L con una solución detergente (0,2% SDS, 50 mM EDTA) sobre el micelio de colonias en desarrollo en medio PDA y de colonias en desarrollo en MM suplementado con 23,5 mM NaNO₃ y 3% de sacarosa. Se mantuvieron las gotas sobre el micelio durante un máximo de 72 horas y se observó si éstas se mantenían intactas durante este tiempo. En la Figura 48 se muestran las imágenes tomadas 1 hora tras la adición de la solución correspondiente para las

colonias en desarrollo de la estirpe silvestre FOP-SP1 y las estirpes mutantes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33 en los dos medios anteriormente indicados. Para todas las estirpes en los dos medios evaluados se observó el mismo fenotipo en las colonias fúngicas: las gotas, bien de agua, bien de solución detergente se mantuvieron intactas sobre la superficie de las colonias y no existió degradación alguna de la pared celular de las hifas, al menos a niveles macroscópicos.

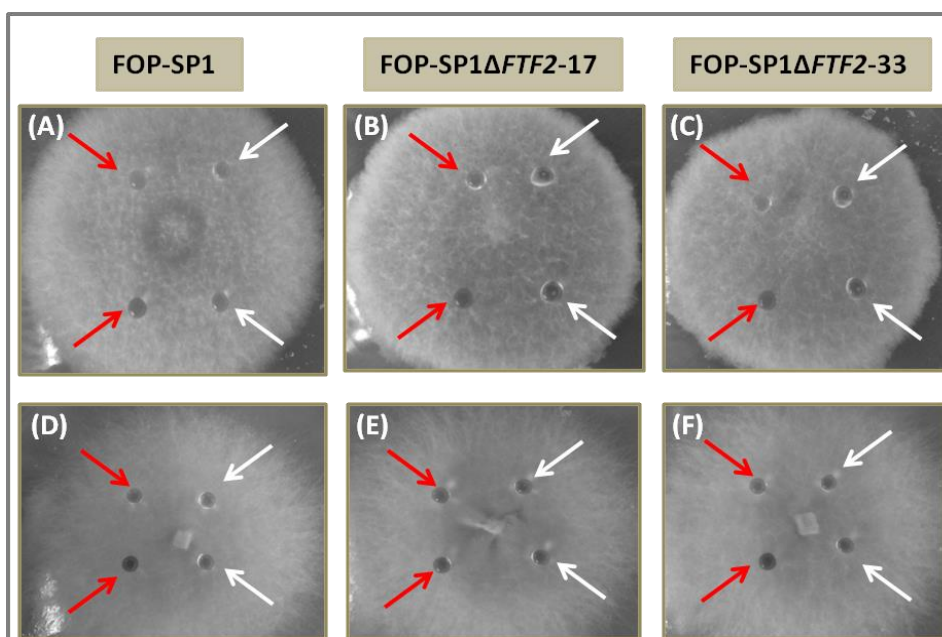


Figura 48. Ensayo de hidrofobicidad del micelio en desarrollo de las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2. Se depositaron gotas de 10 μ L de agua (flechas de color rojo) o de una solución detergente que contenía 0,2% SDS y 50 mM EDTA (flechas de color blanco), y se tomaron las imágenes transcurrida 1 hora. Ensayo sobre colonias en desarrollo en medio PDA (A-C). Ensayo sobre colonias en desarrollo en MM suplementado con 23,5 mM NaNO₃ y 3% sacarosa (D-F).

Con el objetivo de descartar la influencia de la composición del medio sintético en el fenotipo observado, se llevó a cabo el mismo ensayo con los mismos medios de cultivo utilizados durante los ensayos para evaluar la capacidad de crecimiento saprofito (descritos en el apartado 2 de Materiales y Métodos). No se observó ninguna diferencia entre la estirpe silvestre y las mutantes, ni en el grupo de estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 ni en el grupo de estirpes FOP-SP4 Δ FTF2, en todos los casos el micelio se comportó de manera hidrófoba y las gotas con las soluciones empleadas se mantuvieron sobre la superficie de la colonia (Figura 49).

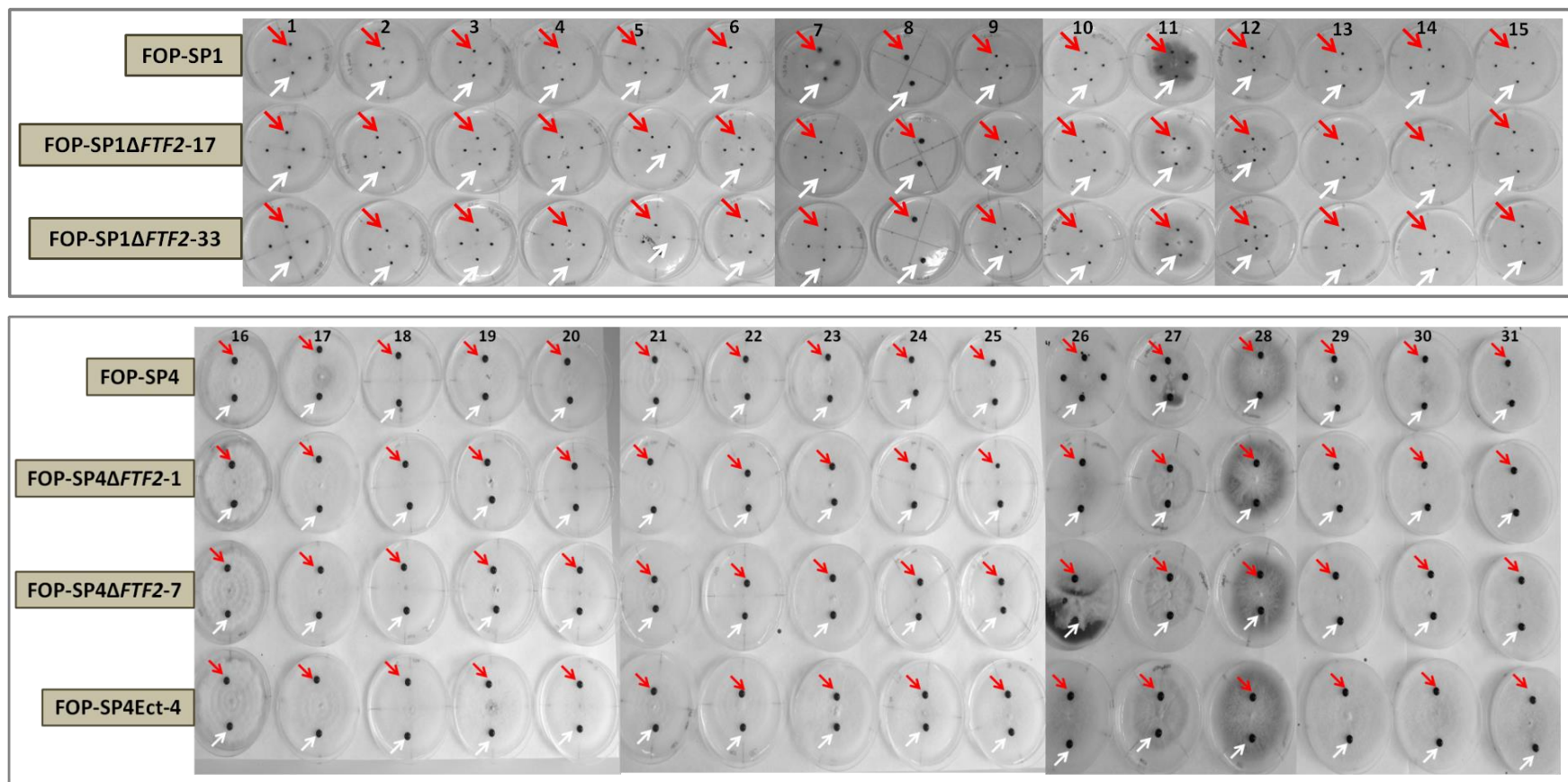


Figura 49. Ensayo de hidrofobicidad del micelio en colonias en desarrollo de las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 (panel superior) y FOP-SP4 Δ FTF2 (panel inferior). Se depositaron gotas de 10 μ L de agua (flechas de color rojo) o de una solución detergente que contenía 0,2% SDS y 50 mM EDTA (flechas de color blanco), y se tomaron las imágenes transcurrida 1 hora. Se evaluó la hidrofobicidad de las colonias en desarrollo de las estirpes durante su crecimiento en MM con sacarosa 0,3% (1, 18), MM con glucosa 3% (2), MM con glucosa 0,3% (3), MM con manosa 3% (4, 23), MM con manosa 0,3% (5, 24), MM con xilosa 3% (6, 19), MM con xilosa 0,3% (7, 20), MM con glicerol 3% (8, 21), MM con glicerol 0,3% (9, 22), MM con NaNO₂ (10, 26), MM con tartrato de amonio (11, 27), MM con NH₄NO₃ (12, 28), MM a pH 4 (13, 29), MM a pH 6 (14, 30), MM a pH 8(15, 31) y medio PDA (16).

Análisis de la patogenicidad y/o virulencia sobre plantas de judía común

La hipótesis de partida en este trabajo proponía que el factor de transcripción FTF2 es un factor de virulencia que participa en el proceso de infección de *F. oxysporum*. Dado que las estirpes poco virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP-SP4) inducen una leve sintomatología de fusarioris en plantas de judía (Alves-Santos *et al.*, 2002), para facilitar la visualización incluso de una leve reducción de la virulencia se decidió evaluar la capacidad patogénica y el grado de virulencia utilizando solamente el grupo de estirpes mutantes FOP-SP1 Δ FTF2.

Para estos análisis se llevaron a cabo ensayos de infección sobre plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad “Blanca Riñón” siguiendo las indicaciones descritas en los apartados 2 y 7 de Materiales y Métodos. Se realizaron tres ensayos de infección independientes inoculando en cada uno de ellos 30 plantas con cada estirpe mutante, la misma cantidad con la estirpe silvestre FOP-SP1, que fueron utilizadas como control positivo del proceso infectivo, y 30 plantas se inocularon con agua utilizándolas como control negativo. En los ensayos se analizaron tres mutantes, las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2-17 y FOP-SP1 Δ FTF2-33, cuyo fenotipo ya se ha descrito en los epígrafes anteriores de este Capítulo, y la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2-3.

Se evaluó la sintomatología mostrada por las plantas inoculadas con las distintas estirpes para determinar la capacidad patogénica y el grado de virulencia de las mismas, analizando cuatro parámetros: el número de hojas cloróticas contabilizado semanalmente durante un tiempo total de 4 semanas (escala CIAT), el número de manchas necróticas presentes en un corte transversal del tallo al final del ensayo (índice de enfermedad), la longitud del tallo desde las hojas cotiledónicas hasta las primeras hojas verdaderas al término del ensayo (longitud de entrenudos), y finalmente la masa de la parte aérea de la planta al final del ensayo de infección. En la Figura 50 se presentan los resultados obtenidos para todos los aspectos evaluados.

El progreso de la fusarioris vascular fue evaluado semanalmente determinando el porcentaje de hojas cloróticas en cada planta y asignando a cada porcentaje el valor de escala CIAT correspondiente (Alves-Santos *et al.*, 1999; Pastor-Corrales y Abawi, 1987). Siguiendo las indicaciones de esta escala, las tres estirpes mutantes incluidas en

los ensayos de infección se consideraron estirpes patógenas poco virulentas al no superarse un valor 8 en la escala CIAT al finalizar el ensayo (7,3 para FOP-SP1 Δ FTF2-3; 7,48 para FOP-SP1 Δ FTF2-17; 6,92 para FOP-SP1 Δ FTF2-33) (Figura 50B). El análisis estadístico ANOVA indicó que las diferencias observadas entre las estirpes mutantes y la estirpe silvestre eran estadísticamente significativas en la semana 2 (para FOP-SP1 Δ FTF2-3 y FOP-SP1 Δ FTF2-17; $P < 0,01$) y en la semana 4 (para las tres estirpes mutantes; $P < 0,001$). Las plantas mostraron síntomas de fusariosis (clorosis foliar, necrosis en tejido vascular), pero tras cuatro semanas de infección no estaban muertas (Figura 50A).

El número de manchas necróticas en cortes transversales del tallo se utilizó como dato complementario a la escala CIAT para llevar a cabo una evaluación más precisa del grado de virulencia de las estirpes mutantes. Para ello se contabilizó el número de manchas necróticas en un corte transversal del tallo a nivel del sustrato al finalizar el ensayo y se asignó un valor numérico comprendido entre 0 (plantas sanas) y 4 (plantas muertas) siguiendo las indicaciones del apartado 7 de Materiales y Métodos. Siguiendo este patrón, las plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 alcanzaron un valor 4, mientras que las plantas inoculadas con cualquiera de las estirpes Δ FTF2 alcanzaron un valor próximo a 3 (3,19 para FOP-SP1 Δ FTF2-3; 3,12 para FOP-SP1 Δ FTF2-17; 2,98 para FOP-SP1 Δ FTF2-33) (Figura 50C). Las diferencias observadas en el índice de infección entre las estirpes mutantes y la silvestre fueron estadísticamente significativas según el análisis estadístico ANOVA realizado ($P < 0,001$).

Finalmente, para completar el análisis de la capacidad patógena y la virulencia de las estirpes mutantes, se evaluó el nivel de crecimiento de las plantas inoculadas con éstas. Por un lado se determinó la masa de la parte aérea de las plantas al finalizar el ensayo, y se observó un incremento estadísticamente significativo en la masa de las plantas inoculadas con las estirpes mutantes (8,10 g para FOP-SP1 Δ FTF2-3; 8,78 g para FOP-SP1 Δ FTF2-17; 8,18 g para FOP-SP1 Δ FTF2-33) en comparación con la masa de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre (0,73 g), siendo valores próximos a las plantas inoculadas con agua (10,99 g) (Figura 50E). Y por otro lado, se analizó el grado de crecimiento de las plantas tomando medidas de la longitud alcanzada por el entrenudo localizado entre las hojas cotiledónicas y las primeras hojas verdaderas al

finalizar el ensayo de infección; así se observó que dicho entrenudo en las plantas inoculadas con las estirpes mutantes era de mayor longitud (1,74 cm para FOP-SP1 Δ FTF2-3; 2,12 cm para FOP-SP1 Δ FTF2-17; 1,84 cm para FOP-SP1 Δ FTF2-33) que el de plantas inoculadas con la estirpe silvestre (0,79 cm), siendo valores próximos al entrenudo medido en plantas sin inocular (2,98 cm) (Figura 50D). Las diferencias observadas, tanto en la masa de la parte aérea de la planta como en la longitud internodal, entre plantas inoculadas con las estirpes Δ FTF2 y plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 fueron estadísticamente significativas según el análisis estadístico ANOVA realizado ($P < 0,001$).

Parte de los resultados obtenidos en este epígrafe se incluyó en la publicación que describe el papel como reguladores de la virulencia de los miembros de la familia génica *FTF* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). En el presente Capítulo se ha profundizado en la caracterización de la capacidad patogénica y la virulencia de las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 incluyendo una estirpe más en los ensayos de infección y ampliando el estudio del grado de crecimiento de la planta analizando también la longitud internodal. La publicación mencionada incluía el análisis de la capacidad patogénica y la virulencia de la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2-FTF2 (estirpe FOP-SP1 Δ FTF2 complementada con la copia nativa de *FTF2*) que mostró el mismo fenotipo que el descrito para la estirpe silvestre FOP-SP1, lo que permitió confirmar que el fenotipo observado en las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 era debido a la interrupción del gen *FTF2*.

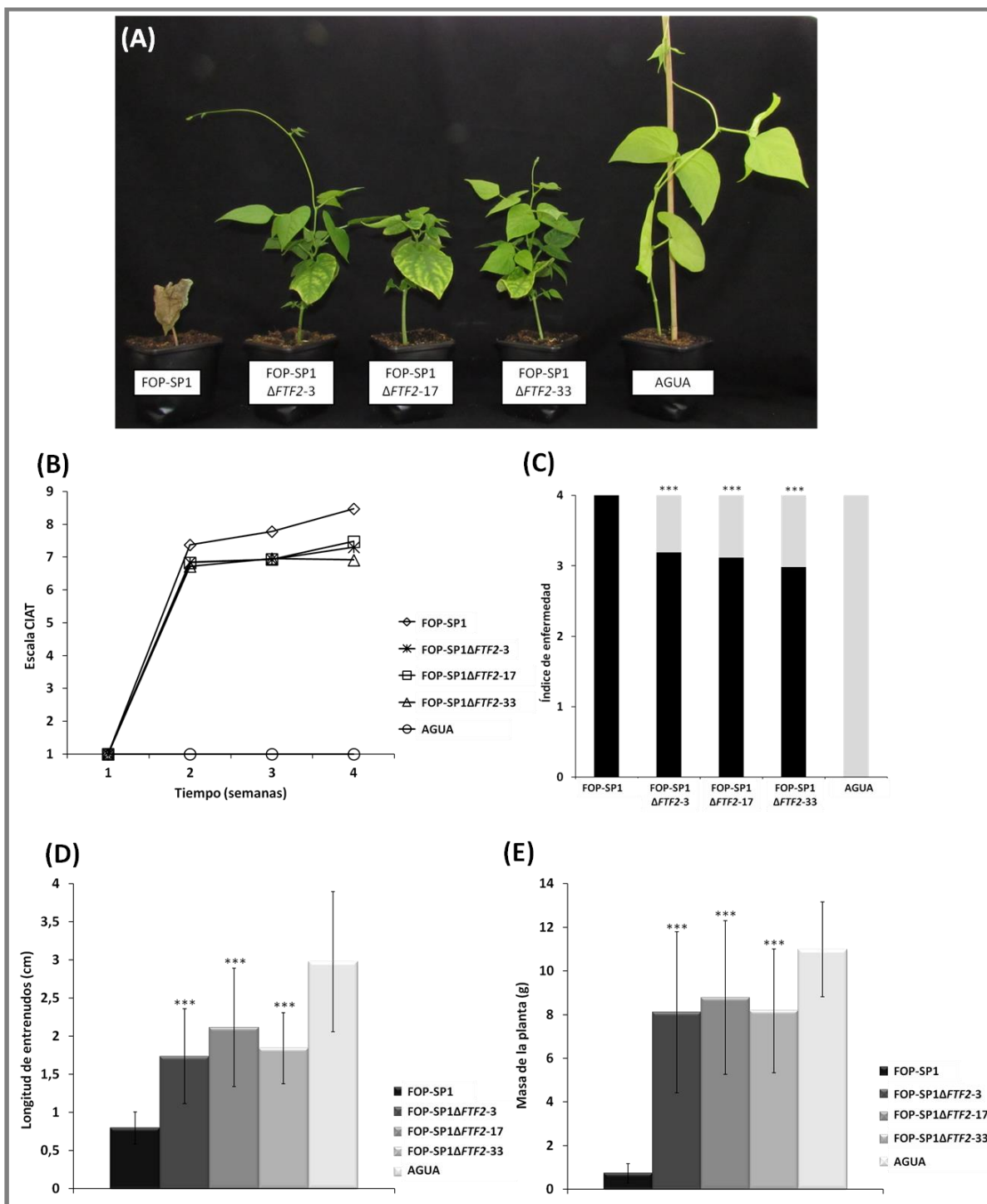


Figura 50. Fusariosis vascular en plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inducida por estirpes FOP-SP1ΔFTF2. Se evaluaron los síntomas de fusariosis sobre 30 plantas inoculadas con cada estirpe mutante (FOP-SP1ΔFTF2-3, FOP-SP1ΔFTF2-17, FOP-SP1ΔFTF2-33) tomando como control de infección 30 plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 y como control negativo 30 plantas inoculadas con agua. **A**, Plantas de judía común 4 semanas después de la inoculación con la estirpe silvestre (izquierda) y con las estirpes mutantes (plantas centrales; por orden, de izquierda a derecha: FOP-SP1ΔFTF2-3, FOP-SP1ΔFTF2-17, FOP-SP1ΔFTF2-33); a la derecha se muestra una planta inoculada con agua. **B-E**, Severidad de síntomas de fusariosis vascular medida con: **(B)** escala CIAT, que se evaluó semanalmente durante 4 semanas para

plantas inoculadas con la estirpe control FOP-SP1 (rombos), con las estirpes mutantes FOP-SP1 Δ FTF2-3 (asteriscos), FOP-SP1 Δ FTF2-17 (cuadrados) y FOP-SP1 Δ FTF2-33 (triángulos), y para plantas inoculadas con agua (círculos); **(C)** índice de enfermedad, asignado al término del ensayo según el número de haces vasculares necróticos y de si la planta está o no muerta; **(D)** longitud internodal (cm) tras 4 semanas, medida entre las hojas cotiledónicas y las primeras hojas verdaderas; y **(E)** masa de la parte aérea de las plantas (g) 4 semanas después de la inoculación. Las barras de cada gráfica muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada mutante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis de la varianza tipo ANOVA seguido de un test de Dunnett's, y se identifican como *** ($P < 0,001$).

Análisis del patrón de colonización de plantas de judía común durante el proceso infectivo

El análisis de la capacidad patogénica y del grado de virulencia de los mutantes FOP-SP1 Δ FTF2 mostró una reducción en los síntomas de fusariosis vascular presentados por las plantas inoculadas con estas estirpes tomando como referencia la estirpe silvestre muy virulenta FOP-SP1, llegando a observarse la sintomatología inducida por estirpes poco virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Alves-Santos *et al.*, 2002; Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Para conocer si este resultado se debía o no a un patrón de colonización de la judía diferente al descrito para la estirpe silvestre (Niño-Sánchez *et al.*, 2015), se llevó a cabo un análisis microscópico sobre secciones de tejido vegetal tomadas de plantas inoculadas con una estirpe delecionada en FTF2 o con la estirpe control FOP-SP1 a distintos tiempos post-inoculación, de forma que se pudo realizar un seguimiento de la colonización fúngica durante el proceso infectivo en las plantas de judía.

Se inocularon plantas en condiciones de hidroponía siguiendo las indicaciones descritas en los apartados 2 y 7 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras del sistema radicular a 1, 2 y 3 dpi, de cuello de raíz a 5 y 7 dpi, y de hipocotilo a 14 y 21 dpi, y se obtuvieron secciones longitudinales y transversales. Inmediatamente después éstas se sometieron a una tinción doble con la aglutinina de germen de trigo WGA/FITC y yoduro de propidio tal y como se describe en el apartado 10 de Materiales y Métodos. Las secciones se visualizaron con la ayuda de un microscopio confocal de barrido láser espectral (TC S2-SP2, Leica Microsystems). Se llevaron a cabo al menos dos inoculaciones independientes con cada estirpe tomando en cada caso muestras

procedentes de tres plantas diferentes para cada uno de los tiempos y regiones analizadas.

Las Figuras 51-57 muestran imágenes representativas de los diferentes ensayos biológicos para cada estirpe, región y tiempo evaluados. Las imágenes tomadas a 1 dpi del sistema radicular (Figura 51) no evidenciaron diferencias claras en la adhesión del hongo a la raíz entre las estirpes silvestre y mutante; sin embargo, a 2 y 3 dpi (Figuras 52 y 53) se observó un retraso en la colonización del tejido radicular por parte de la estirpe mutante respecto a la colonización debida a la estirpe silvestre, quedándose restringida la primera a la superficie exterior de la raíz mientras la segunda ya había comenzado a colonizar el tejido parenquimático de la misma. A 5 dpi, en la región del cuello de raíz (Figura 54) de plantas inoculadas con la estirpe mutante sólo se observaron algunos haces vasculares colapsados por el micelio; sin embargo en la misma región de plantas inoculadas con la estirpe silvestre se observó colonización de todo el tejido parenquimático y un mayor número de haces xilemáticos ocluidos por el micelio. En tiempos más prolongados del proceso de infección (7 dpi) en cuello de raíz (Figura 55), las imágenes mostraron una distribución mayoritaria de la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2 en el tejido parenquimático observándose un número reducido de haces vasculares colonizados; por su parte, la estirpe silvestre, se localizó fundamentalmente en el interior de los haces vasculares. Esta distribución de una y otra estirpe se mantuvo durante la colonización del hipocotilo a 14 dpi (Figura 56), existiendo una distribución prácticamente restringida al tejido vascular para la estirpe silvestre FOP-SP1, mientras que la estirpe mutante FOP-SP1 Δ FTF2, si bien también se localizaba en algunos haces vasculares, se encontró principalmente colonizando el tejido parenquimático. A los 21 dpi en hipocotilo (Figura 57) se observó un gran crecimiento de la estirpe silvestre tanto en tejido vascular como parenquimático, mientras que la estirpe mutante se distribuyó en el tejido parenquimático que rodea al anillo vascular colonizando apenas unos pocos haces vasculares.

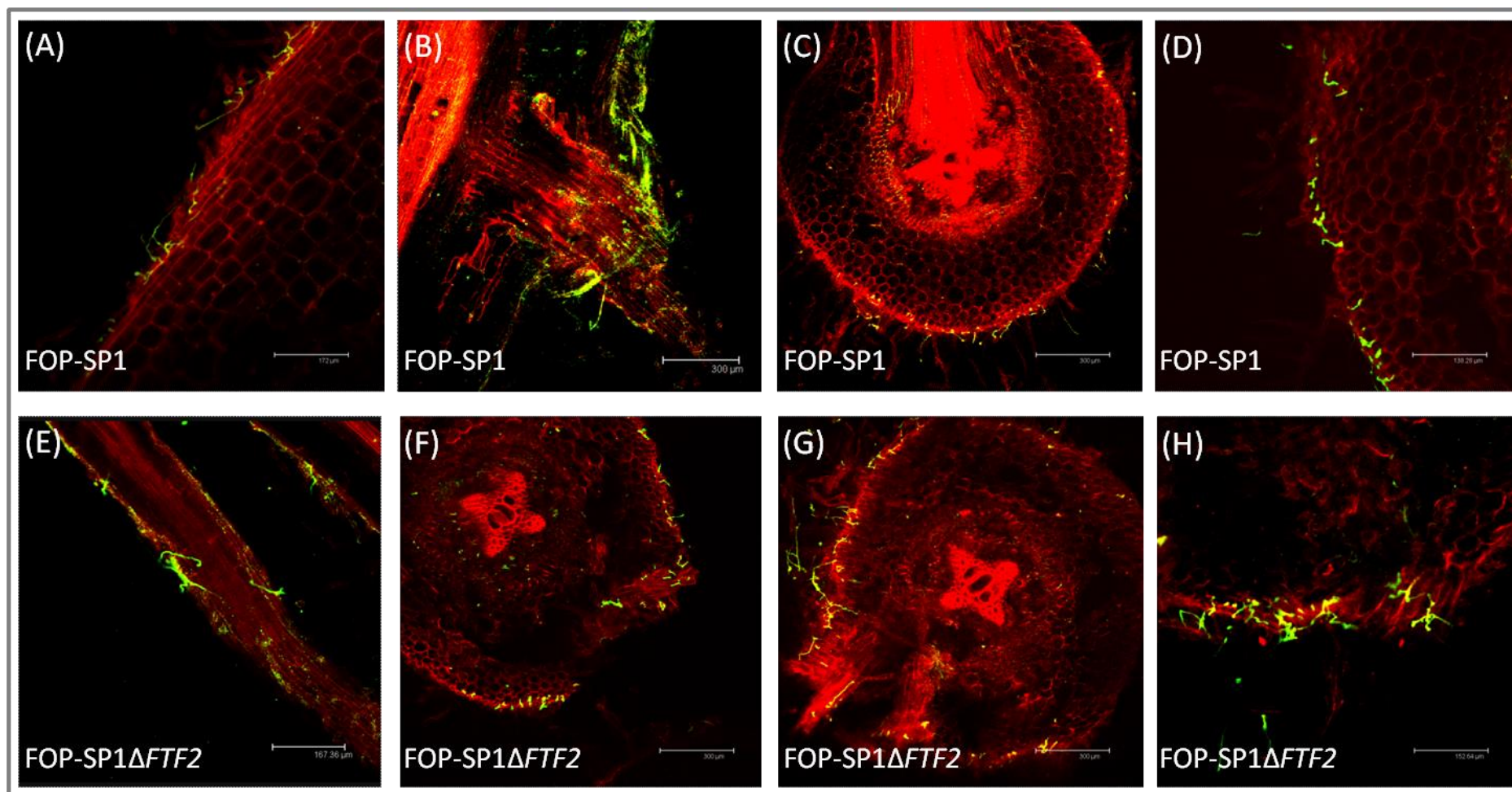


Figura 51. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 1 dpi. La colonización del sistema radicular de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-D) y FOP-SP1 Δ FTF2 (E-H) se visualizó mediante microscopía láser confocal 1 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio en secciones longitudinales (A, B, E) y transversales (C, D, F, G, H).

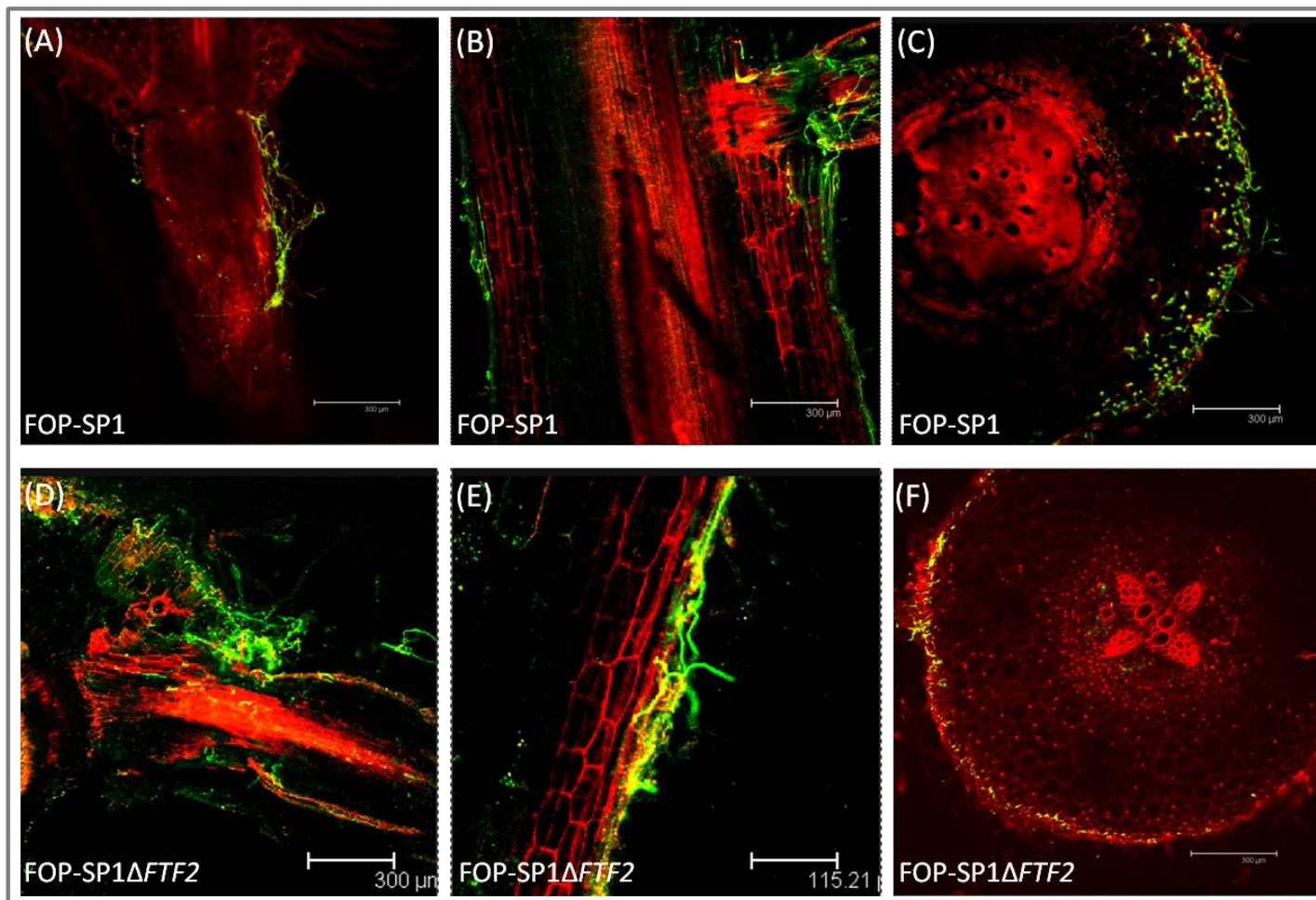


Figura 52. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre **FOP-SP1 y mutante **FOP-SP1 Δ FTF2** a 2 dpi.** La colonización del sistema radicular de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-C) y FOP-SP1 Δ FTF2 (D-F) se visualizó mediante microscopía láser confocal 2 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio en secciones longitudinales (A, B, E) y transversales (C, D, F).

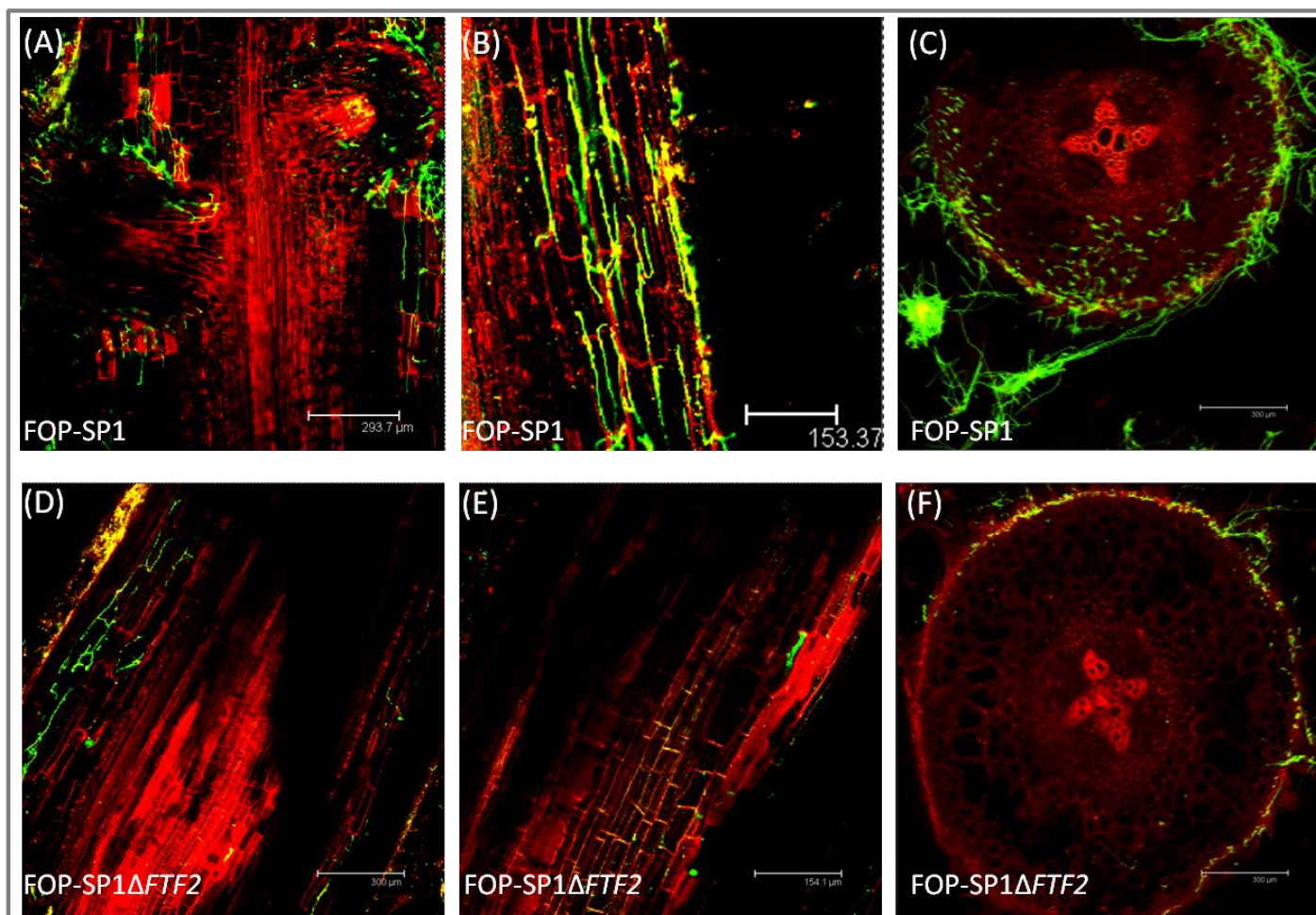


Figura 53. Colonización del sistema radicular de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 3 dpi. La colonización del sistema radicular de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-C) y FOP-SP1 Δ FTF2 (D-F) se visualizó mediante microscopía láser confocal 3 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio en secciones longitudinales (A, B, D, E) y transversales (C, F).

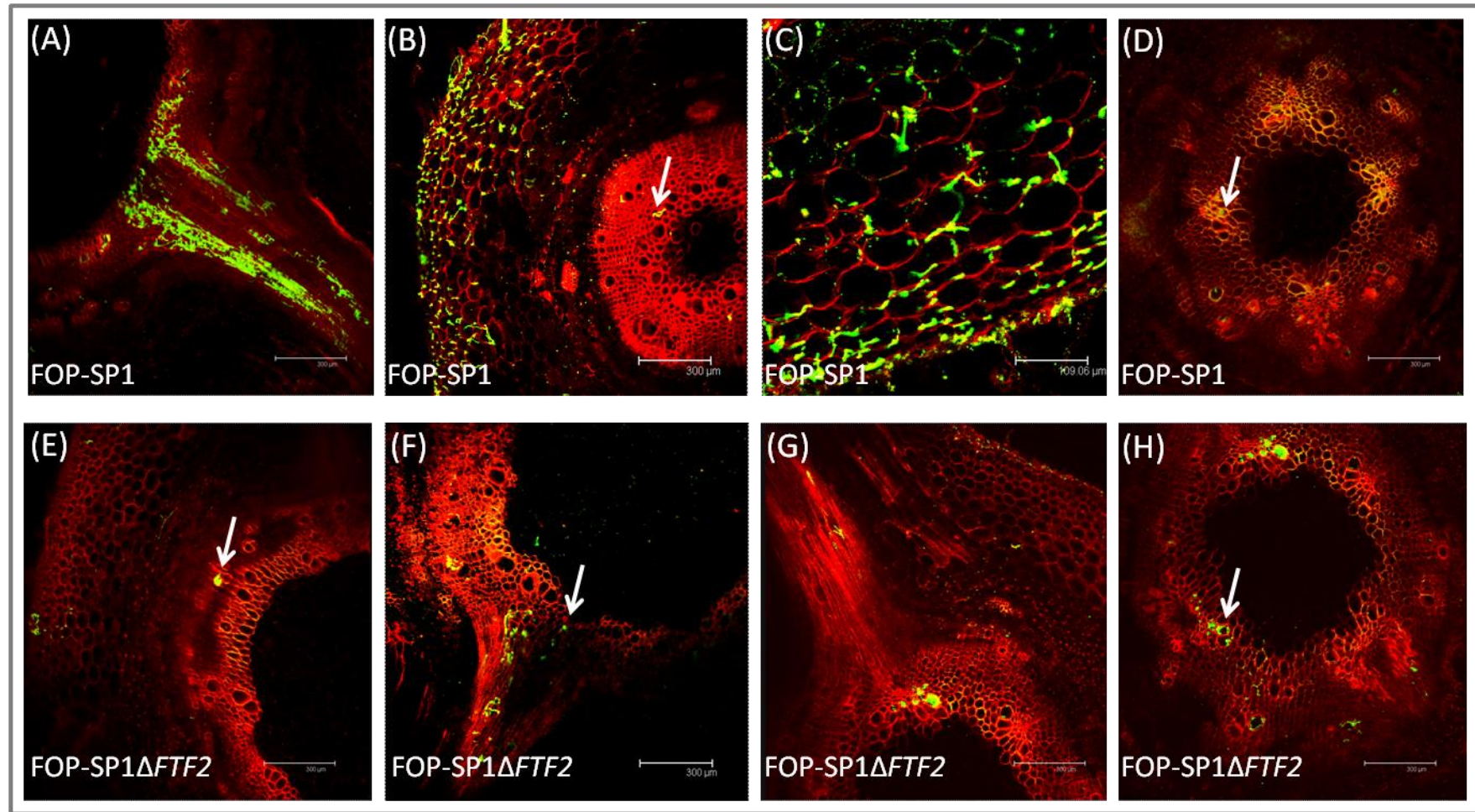


Figura 54. Colonización del cuello de raíz de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 5 dpi. La colonización del cuello de raíz de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-D) y FOP-SP1 Δ FTF2 (E-H) se visualizó mediante microscopía láser confocal 5 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio. Las flechas blancas señalan el crecimiento fúngico dentro de los haces vasculares xilemáticos.

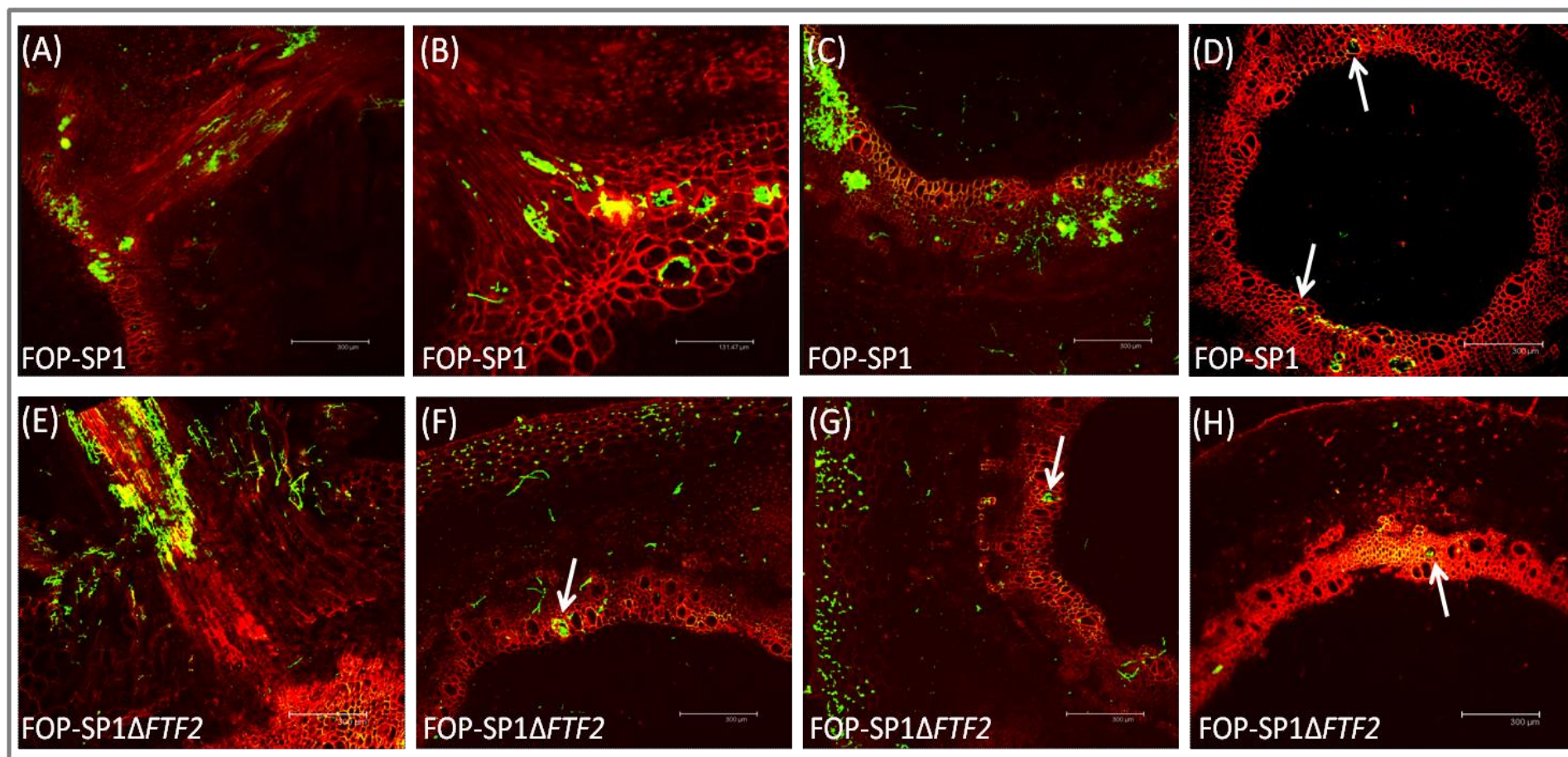


Figura 55. Colonización del cuello de raíz de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 7 dpi. La colonización del cuello de raíz de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-D) y FOP-SP1 Δ FTF2 (E-H) se visualizó mediante microscopía láser confocal 7 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio. Las flechas blancas señalan el crecimiento fúngico dentro de los haces vasculares xilemáticos.

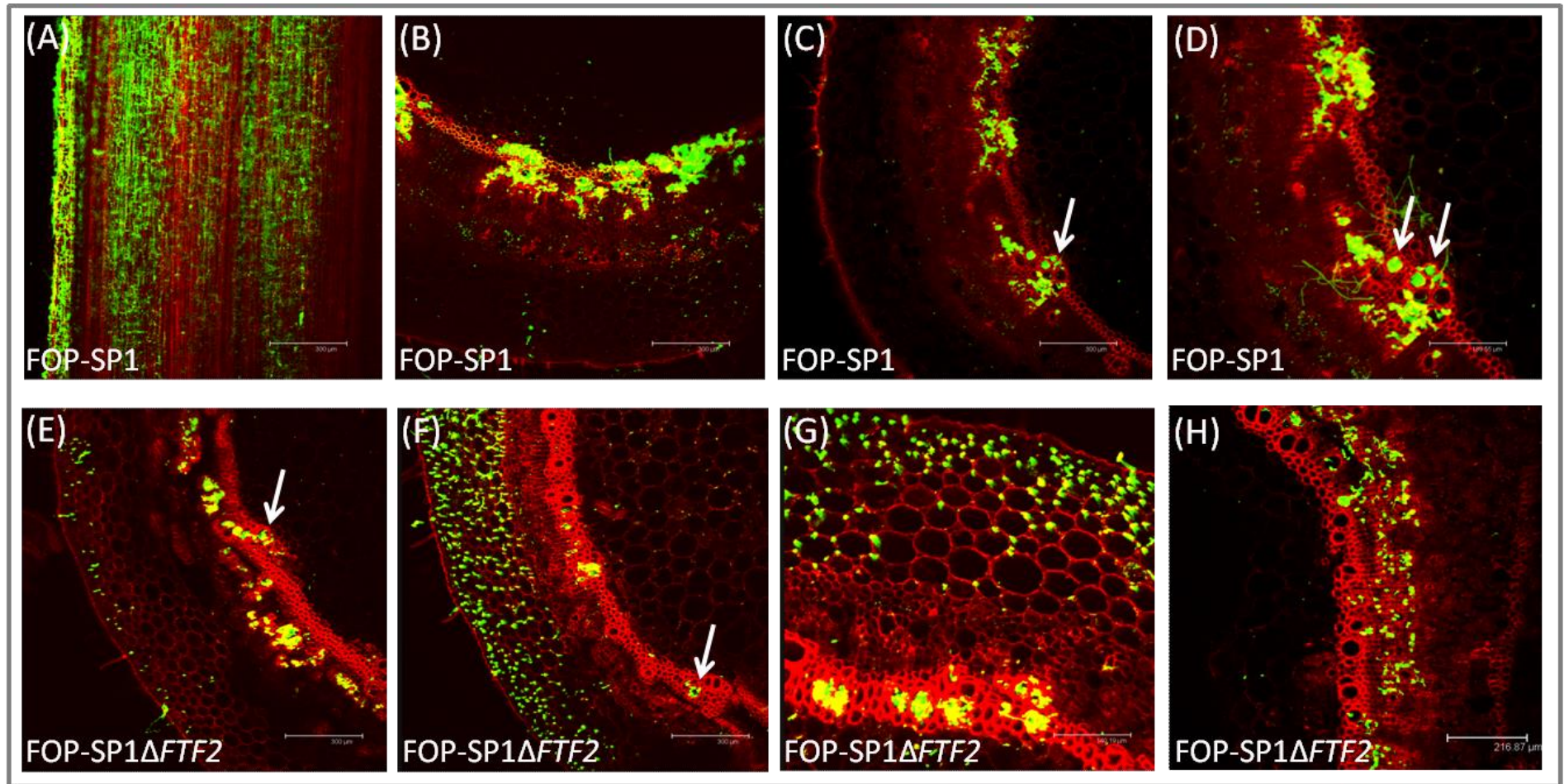


Figura 56. Colonización del hipocotilo de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 14 dpi. La colonización del hipocotilo de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-D) y FOP-SP1 Δ FTF2 (E-H) se visualizó mediante microscopía láser confocal 14 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio. Las flechas blancas señalan el crecimiento fúngico dentro de los haces vasculares xilemáticos.

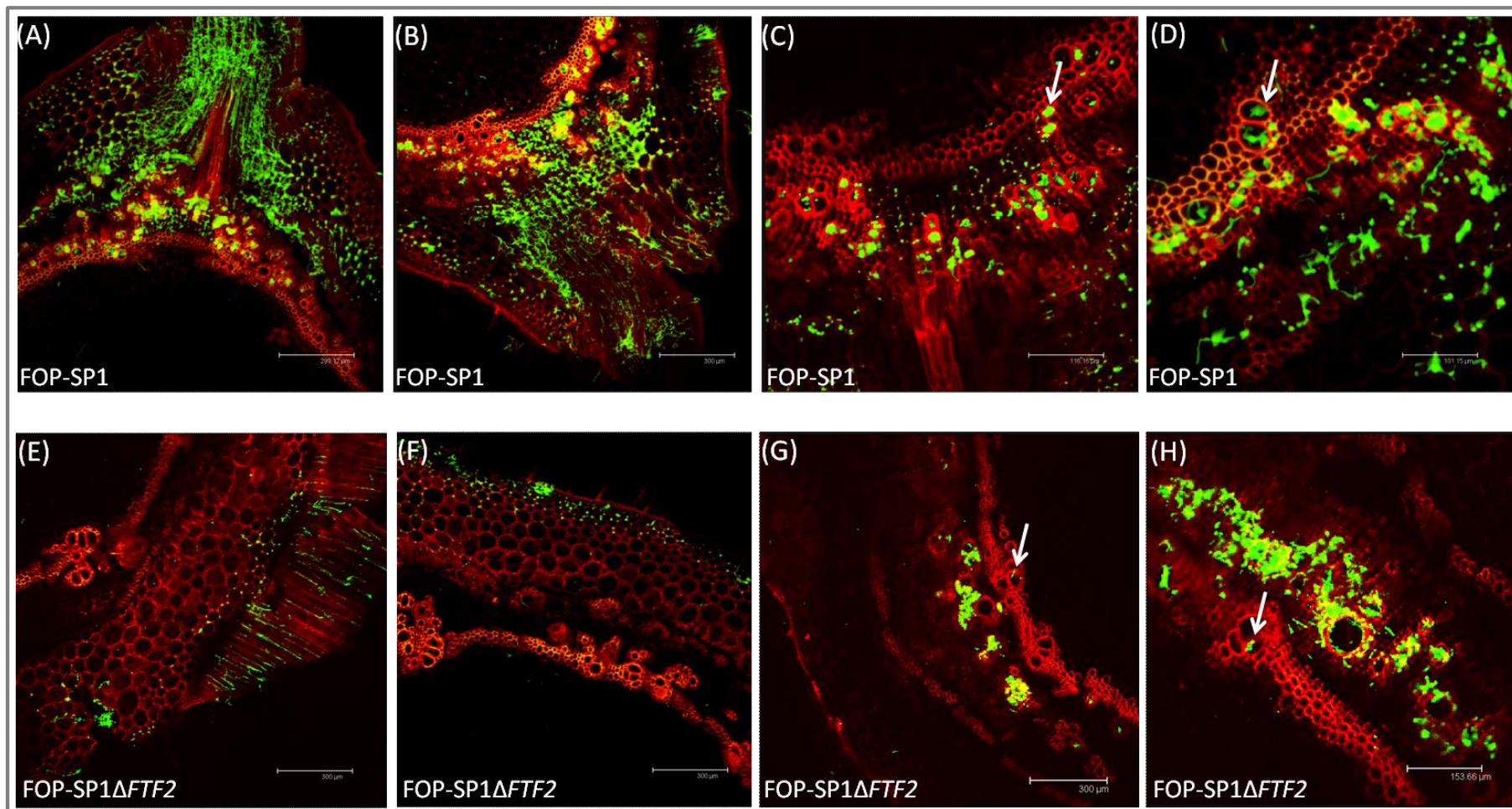


Figura 57. Colonización del hipocotilo de plantas de judía (*P. vulgaris* L.) inoculadas con las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1 Δ FTF2 a 21 dpi. La colonización del hipocotilo de plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 (A-D) y FOP-SP1 Δ FTF2 (E-H) se visualizó mediante microscopía láser confocal 21 dpi tras la doble tinción con WGA-AF488/yoduro de propidio. Las flechas blancas señalan el crecimiento fúngico dentro de los haces vasculares xilemáticos.

Para conocer si las diferencias observadas en el patrón de colonización entre la estirpe silvestre FOP-SP1 y la mutante FOP-SP1 Δ FTF2 se debían a una alteración en la acumulación de micelio durante las primeras etapas del proceso infectivo, se llevó a cabo una cuantificación de la biomasa fúngica en muestras del sistema radicular de plantas inoculadas con una u otra estirpe en los mismos tiempos en los que se evaluó el patrón de colonización por microscopía (1, 2 y 3 dpi). Para ello se estimó la cantidad relativa de ADN fúngico respecto a la cantidad de ADN de la planta mediante PCR cuantitativa tal y como se detalla en el apartado 17 de Materiales y Métodos. La cuantificación se realizó sobre muestras procedentes de tres ensayos biológicos independientes, y en cada uno sobre dos réplicas técnicas de obtención de ADN genómico.

La Figura 58 muestra los resultados medios obtenidos de las reacciones de PCR realizadas para los tres ensayos biológicos. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre la acumulación de micelio de la estirpe silvestre y la de la estirpe mutante en el sistema radicular, observándose en ambos casos un incremento de biomasa fúngica a lo largo del tiempo hasta los 3 dpi en esta región de la planta.

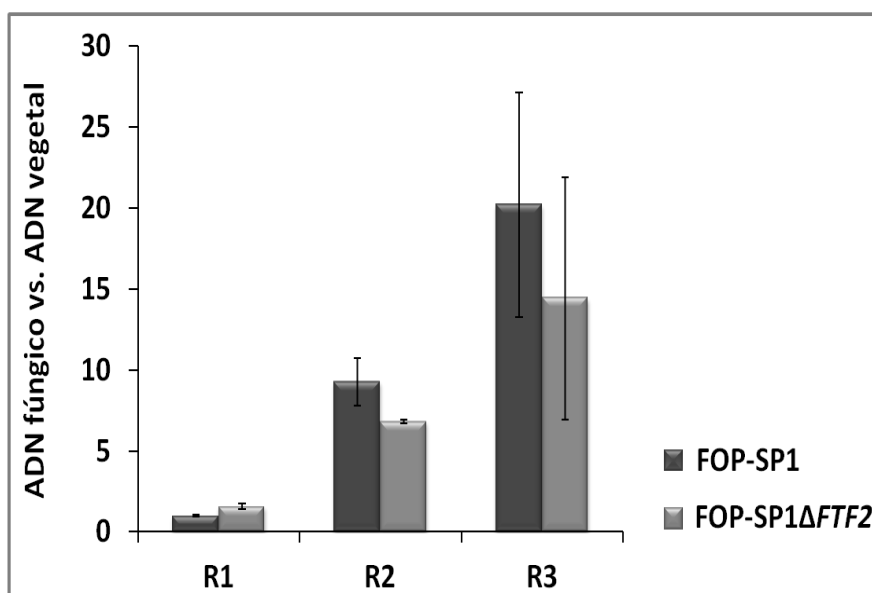


Figura 58. Cuantificación de biomasa fúngica en plantas de *P. vulgaris* L. inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 y la estirpe mutante FOP-SP1 Δ FTF2. El ADN de hongo se cuantificó mediante RT-qPCR utilizando ADN obtenido de muestras del sistema radicular a 1, 2 y 3 dpi (R1, R2 y R3) y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para FOP-SP1 en R1 (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes.

Respuesta defensiva de *Phaseolus vulgaris* durante la fusariosis vascular inducida por mutantes interrumpidos en *FTF2*

Ante las diferencias observadas entre la estirpe silvestre y la estirpe $\Delta FTF2$ en cuanto a la capacidad infectiva sobre plantas de judía y el patrón de colonización durante el proceso de infección, se decidió llevar a cabo un análisis de la respuesta defensiva de la planta. Para ello se evaluó la expresión de genes cuyos productos están involucrados en vías de defensa activadas durante la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) que han sido relacionadas con la defensa vegetal frente a patógenos (Hammerschmidt, 1999; Kuć, 1982; Ryals *et al.*, 1996). Por un lado se analizó la respuesta defensiva mediada por ácido salicílico a través de la expresión del gen *PR1*, y por otro lado la respuesta de defensa mediada de manera conjunta por etileno/ácido jasmónico estudiando la expresión de los genes *ERF1* y *ERF2*.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación describieron el patrón de expresión de *FTF2* durante el proceso de infección por parte de la estirpe silvestre FOP-SP1 (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Tomando como referencia estos resultados previos, para evaluar el patrón de expresión de genes de defensa seleccionamos muestras de sistema radicular a 3dpi, de cuello de raíz a 7 dpi y de hipocotilo a 21 dpi, regiones de la planta y tiempos en los que se había demostrado una inducción en la expresión de *FTF2* (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

Se realizó un análisis de RT-qPCR utilizando como molde ADN copia generado a partir de ARN extraído de muestras de sistema radicular, cuello de raíz e hipocotilo de plantas inoculadas con la estirpe silvestre o con la estirpe FOP-SP1 $\Delta FTF2$ en los tiempos previamente indicados. Se llevaron a cabo tres ensayos de infección independientes con dos réplicas técnicas en cada uno de ellos y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado para cada muestra y gen analizado, tal y como se detalla en el apartado 17 de Materiales y Métodos. En la Figura 59 se presentan los resultados de la expresión para las dos estirpes y los tres genes evaluados en las regiones y tiempos ya mencionados.

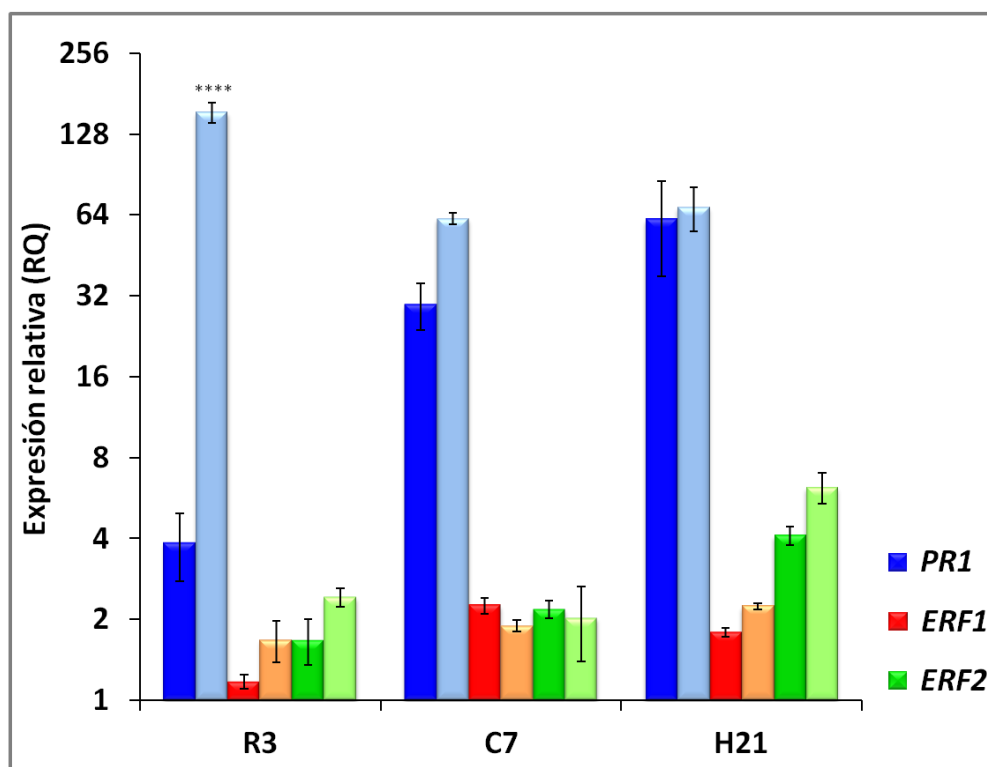


Figura 59. Análisis de expresión por RT-qPCR de genes de judía involucrados en la respuesta defensiva de plantas colonizadas por la estirpe silvestre FOP-SP1 y la estirpe FOP-SP1ΔFTF2. Se evaluó la expresión en sistema radicular a 3 dpi (R3), cuello de raíz a 7 dpi (C7) e hipocotilo a 21 dpi (H21). Las medidas de expresión relativa (RQ) se indican en escala logarítmica en base 2. Las barras oscuras para cada color representan la expresión de cada gen en plantas colonizadas por la estirpe silvestre FOP-SP1; las barras claras indican la expresión de cada gen en plantas colonizadas por la estirpe FOP-SP1ΔFTF2. Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen de la *Actina* de la judía común como gen endógeno. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para plantas de judía común inoculadas con agua en cada región y tiempo evaluado (valor arbitrario de 1,0) (datos no mostrados). Las barras muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre la estirpe mutante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis *t*-test y se identifican como **** ($P < 0,0001$).

La expresión del gen *PR1* (vía defensiva mediada por ácido salicílico) se mostró inducida en plantas inoculadas tanto con la estirpe silvestre como con la estirpe FOP-SP1ΔFTF2 desde el comienzo de la infección (sistema radicular, 3 dpi) hasta el final de la misma (hipocotilo, 21 dpi). A pesar de la inducción en ambos casos, en el sistema radicular a los 3 dpi ésta fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en plantas inoculadas con la estirpe mutante (expresión relativa de 154,5) que en plantas inoculadas con la estirpe silvestre (expresión relativa de 3,86); esta diferencia se redujo en cuello de raíz a los 7 dpi (62,1 para la estirpe mutante; 29,67 para la estirpe

silvestre) y llegó a anularse en hipocotilo a los 21 dpi (68,45 para FOP-SP1 Δ FTF2; 61,64 para FOP-SP1).

Por otro lado, los resultados obtenidos para la expresión de los genes *ERF* (ruta de defensa mediada por etileno/ácido jasmónico) no indicaron una inducción tan clara como la observada para el gen *PR1* en ninguna de las regiones analizadas para ninguna de las dos estirpes. Específicamente en hipocotilo a 21 dpi para el gen *ERF2* se observó una ligera inducción de la expresión en las dos estirpes (4,1 para FOP-SP1; 6,2 para FOP-SP1 Δ FTF2). Las pequeñas diferencias observadas en la expresión para ambos genes entre las dos estirpes no resultaron estadísticamente significativas según el análisis estadístico *t*-test.

Análisis de transcriptómica comparada (*RNAseq*) con mutantes interrumpidos en *FTF2*

La caracterización fenotípica *in vitro* e *in planta* de las estirpes Δ FTF2 sugiere una implicación del factor de transcripción en el proceso de esporulación así como en el desarrollo del proceso de infección sobre plantas de judía. Se desconoce cuáles son los genes o las rutas metabólicas que regula FTF2 para controlar ambos procesos, por ello se decidió realizar un análisis de transcriptómica comparada mediante *RNAseq* (Wang *et al.*, 2009).

Las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 proceden de la estirpe silvestre FOP-SP1 en cuyo genoma, como ya se ha descrito previamente, hay hasta cuatro parálogos de *FTF1*. La elevada homología existente entre los parálogos de *FTF1* y la copia de *FTF2* (83% en la región codificante) (Niño-Sánchez *et al.*, 2016) limita las posibilidades para discriminar entre unas y otra basándose exclusivamente en su secuencia nucleotídica. Con el objetivo de evitar resultados cruzados en el análisis transcriptómico entre ambos genes, se decidió realizar dicho análisis con mutantes FOP-SP4 Δ FTF2 procedentes de una estirpe silvestre carente de los parálogos de *FTF1*.

Para los análisis de transcriptómica comparada se seleccionó aleatoriamente la estirpe FOP-SP4 Δ FTF2-7. El método de secuenciación *RNAseq* parte de una población de ARN obtenido, en este caso, a partir de micelio formado durante el crecimiento *in vitro* del hongo. De esta forma se obtendrán perfiles transcriptómicos inducidos en

cultivos de medio líquido tanto para la estirpe silvestre como para la mutante. Para la obtención del ARN, se inocularon esporas en medio líquido PDB a una concentración de 10^6 esporas/mL y se permitió el crecimiento fúngico a 25°C y 120 r.p.m. durante 48 horas bajo iluminación permanente. Pasado este tiempo se recogió el micelio, se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido y se procedió a extraer el ARN total con el kit comercial SV Total RNA Isolation System Z3105 (Promega), tal y como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes la integridad de las muestras de ARN y se estimó la concentración por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se realizaron tres ensayos biológicos independientes obteniendo tres poblaciones de ARN para la estirpe silvestre FOP-SP4 y la misma cantidad para la estirpe mutante FOP-SP4 Δ FTF2-7. Se utilizaron 5 μ g de ARN total de cada una de las muestras para su secuenciación, en total 3 muestras para cada estirpe.

Las lecturas de ADNc obtenidas tras la secuenciación se alinearon frente al genoma anotado de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (JGI, <http://genome.jgi.doe.gov/Fusox2/Fusox2.home.html>). Se realizó una selección de aquellos *loci* que mostraron las diferencias de expresión significativas más interesantes utilizando como criterio de selección la elevada expresión en la estirpe silvestre y la expresión reducida en el mutante FOP-SP4 Δ FTF2. Se eligió este criterio para obtener una selección preliminar de los *loci* candidatos a mostrar una regulación más fuerte por FTF2. En la Tabla 11 (Apéndice II) se presenta el conjunto de *loci* seleccionado indicando el nivel de expresión para ambas estirpes y la función predicha para las proteínas codificadas.

El análisis pormenorizado de todos los *loci* seleccionados excede de los objetivos planteados en el presente trabajo de Tesis Doctoral, por lo que se decidió seleccionar algunos *loci* de la lista de candidatos para verificar su expresión mediante RT-qPCR en la estirpe silvestre y la estirpe mutante. Los *loci* seleccionados fueron los siguientes:

- **FOXG_08907** (Sc 11, 171268-172727, Cromosoma 9). Codifica para una dioxigenasa de la superfamilia SSF49482.
- **FOXG_14731** (Sc 23, 674285-675352, Cromosoma 12). Codifica una 2-oxoglutarato-Fe (II) oxigenasa de la superfamilia SSF51197.

- **FOXG_02748** (Sc 3, 324638-326711, Cromosoma 8). Codifica una hidrofobina de tipo II de la superfamilia SSF101751.
- **FOXG_02746** (Sc 3, 321058-321854, Cromosoma 8). Codifica una hidrofobina de tipo II de la superfamilia SSF101751.
- **FOXG_14730** (Sc 23, 672488-673100, Cromosoma 12). Codifica una proteína con dominio SET, implicado en metilación en *Neurospora crassa*, de la superfamilia SSF82199.
- **FOXG_04430** (Sc 4, 2124086-2126883, Cromosoma 4). Codifica una dioxigenasa del catabolismo de la taurina de la superfamilia SSF51197.
- **FOXG_13421** (Sc 19, 922950-924751, Cromosoma 12). Codifica una oxidasa de unión a cobre de la superfamilia SSF49503 (dioxigenasa de cobre, lacasa).
- **FOXG_13497** (Sc 19, 1108815-1111145, Cromosoma 12). Codifica una monooxigenasa con dominio de unión a FAD (superfamilia SSF51905), con dominio tiorredoxina (superfamilia SSF52833) y dominio reductasa de unión a FAD (superfamilia SSF54373).

El análisis de verificación de la expresión de estos genes mediante RT-qPCR incluyó, además de los *loci* seleccionados, el gen *FTF2* para verificar la nula expresión en el mutante FOP-SP4 Δ *FTF2*. También se incluyó en el análisis la estirpe FOP-SP4Ect-4 como control, buscando descartar posibles resultados debidos a la integración del alelo mutante en el genoma fúngico y no determinados por la interrupción en sí del alelo silvestre de *FTF2*. Para este análisis se reprodujo el ensayo realizado para obtener el ARN que fue secuenciado, en las mismas condiciones y tiempos de recogida de muestras. Se realizaron tres ensayos biológicos independientes y para cada uno, dos réplicas técnicas de obtención de ADNc.

En la Figura 60 se presentan los resultados de la expresión media obtenidos para los *loci* analizados en las tres estirpes. No se obtuvo amplificación para el gen *FTF2* en la estirpe mutante FOP-SP4 Δ *FTF2*, lo que demostró la delección del gen en esta estirpe. En cuanto a los *loci* seleccionados del análisis transcriptómico, para FOXG_08907, FOXG_13421 y FOXG_13497 no se consiguió obtener amplificación en ninguna de las tres estirpes incluidas en el análisis. Para el resto de genes se consiguió amplificar el fragmento de interés, y en los cinco casos, para la estirpe mutante, se

observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de expresión relativa respecto a los niveles de expresión observados para las estirpes silvestre FOP-SP4 y control FOP-SP4Ect-4.

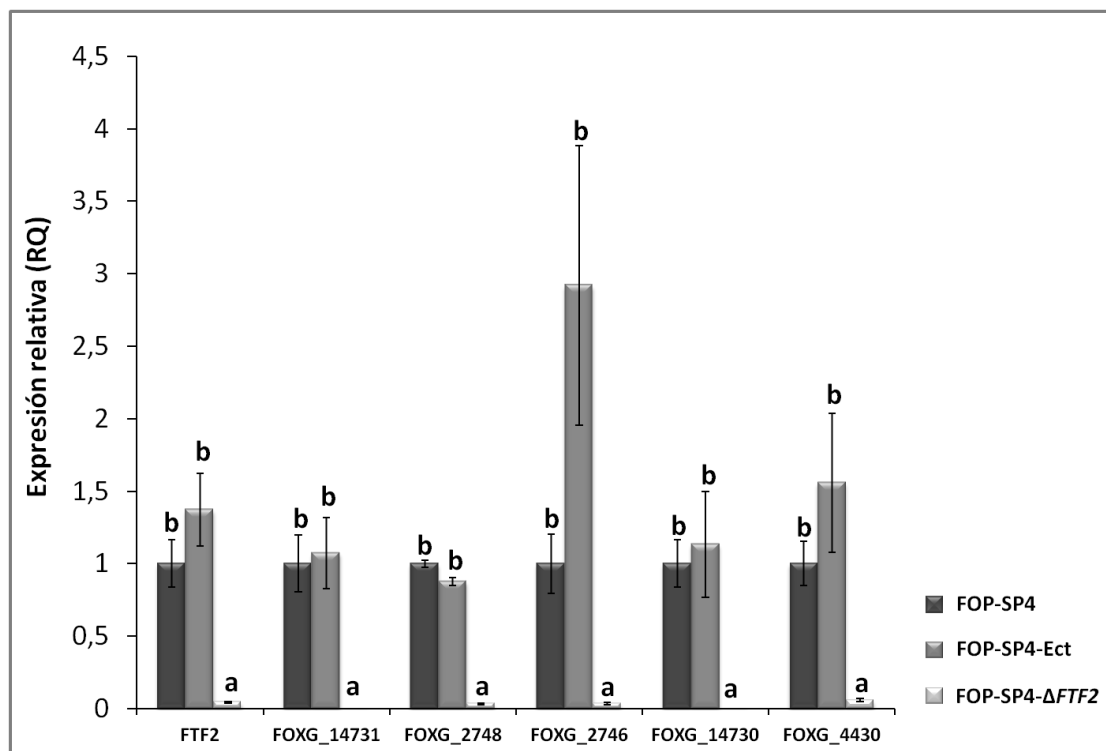


Figura 60. Análisis de expresión por RT-qPCR de loci candidatos a estar regulados por el factor de transcripción FTF2 en estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Se evaluó la expresión en ADNc generado a partir de ARN obtenido de muestras de micelio cultivado en PDB y recogido 48 horas tras la inoculación de las esporas. Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen *EF1 α* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* como gen endógeno. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para la estirpe silvestre FOP-SP4 en cada locus evaluado (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las letras sobre las barras muestran las diferencias existentes en la expresión relativa entre las tres estirpes en cada locus según el test de Tukey HSD ($P < 0,001$).

Análisis de expresión de genes fúngicos en mutantes interrumpidos en *FTF2* durante el proceso de infección en judía

El análisis transcriptómico llevado a cabo en este Capítulo permitió identificar genes presumiblemente regulados por FTF2 cuya expresión se demostró drásticamente reducida en la estirpe mutante Δ FTF2. Con el objetivo de conocer si

alguno de los productos codificados por estos genes presenta relevancia durante el proceso de colonización de la planta por *F. oxysporum*, se decidió realizar un análisis de expresión génica en plantas inoculadas con el hongo. Para ello se realizaron ensayos de infección sobre judía común inoculándolas con la estirpe silvestre muy virulenta FOP-SP1 o con la estirpe mutante FOP-SP1 Δ FTF2, y se recogieron muestras de sistema radicular a 3 dpi, de cuello de raíz a 7 dpi y de hipocotilo a 21 dpi, regiones de la planta y tiempos en los que se ha demostrado una inducción en la expresión de *FTF2* durante la colonización por *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). A partir de estas muestras se extrajo ARN total que sirvió para obtener ADNc usado como molde en las reacciones de RT-qPCR siguiendo las indicaciones descritas previamente en este mismo Capítulo.

Se evaluó el perfil de expresión de los ocho *loci* seleccionados en el análisis transcriptómico y de *FTF2*. Para los *loci* FOXG_08907, FOXG_02748, FOXG_04430, FOXG_13421 y FOXG_13497 no se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras analizadas. Para los *loci* FOXG_14730 (codificador para una proteína con dominio SET), FOXG_14731 (codificador para una oxigenasa) y FOXG_02746 (codificador para una hidrofobina de tipo II) se obtuvo amplificación en algunas muestras de plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1. La Figura 61 muestra los resultados de expresión génica obtenidos para estos tres *loci* y para *FTF2* en las tres regiones seleccionadas para plantas inoculadas con cada una de las estirpes fúngicas.

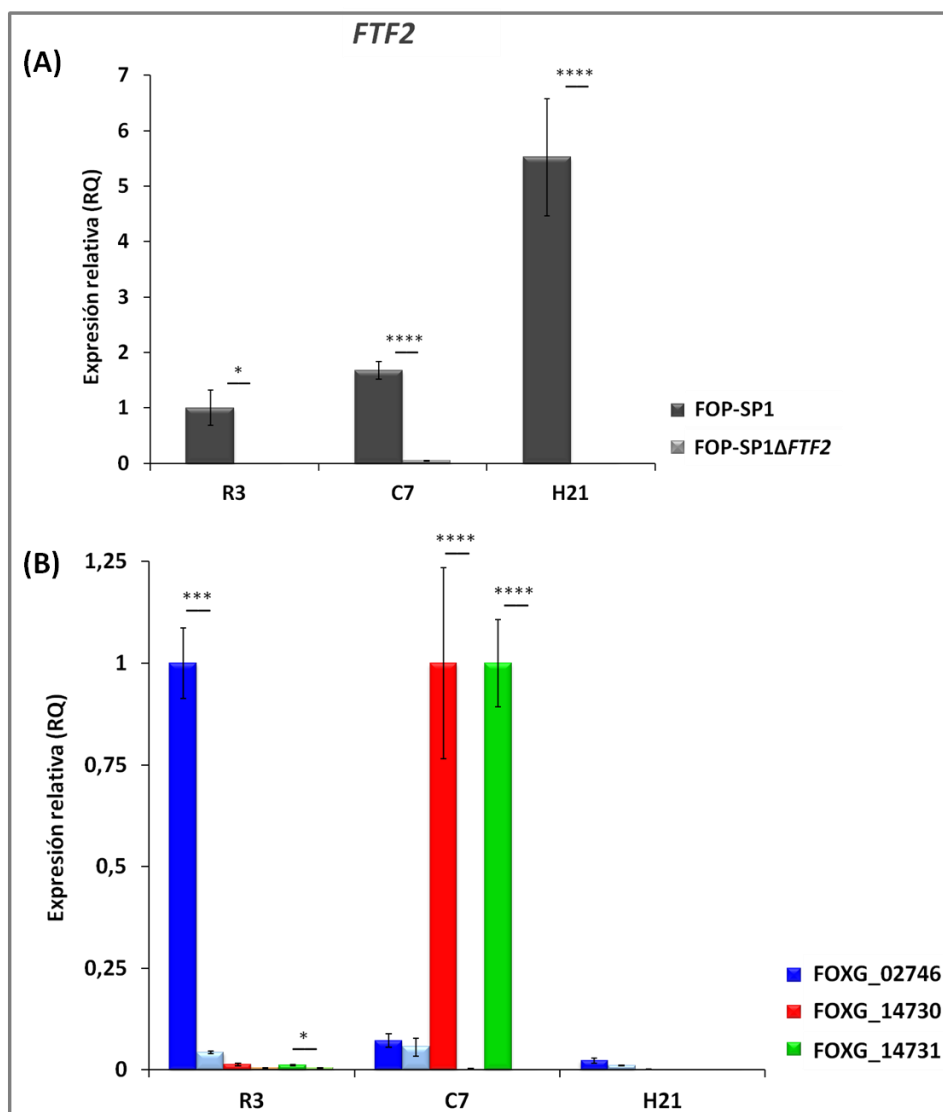


Figura 61. Análisis de expresión por RT-qPCR de genes presumiblemente regulados por FTF2 en plantas colonizadas por las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP1ΔFTF2. **A**, Expresión de *FTF2* en plantas colonizadas por las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1ΔFTF2. **B**, Expresión de genes presumiblemente regulados por FTF2. Las barras oscuras para cada color representan la expresión de cada gen en plantas colonizadas por la estirpe silvestre FOP-SP1; las barras claras, en plantas colonizadas por la estirpe FOP-SP1ΔFTF2. Se evaluó la expresión de todos genes en sistema radicular a 3 dpi (R3), cuello de raíz a 7 dpi (C7) e hipocotilo a 21 dpi (H21). En todos los casos, los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen *EF1α* de *F. oxysporum* como gen endógeno. Para los *loci* *FTF2* y FOXG_02746 las medidas se referenciaron al valor de expresión obtenido en sistema radicular de plantas inoculadas con la estirpe silvestre a 3 dpi; para los *loci* FOXG_14730 y FOXG_14731, al valor de expresión obtenido en cuello de raíz de plantas inoculadas con la estirpe silvestre a 7 dpi (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre la estirpe mutante y la estirpe control se evaluaron mediante un análisis *t*-test y se identifican como * ($P < 0,05$), *** ($P < 0,001$) y **** ($P < 0,0001$).

En plantas inoculadas con la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2 no se observó expresión del gen *FTF2*, mientras que en plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 se observó un incremento significativo en la expresión del gen en las tres regiones analizadas alcanzando su máximo de expresión en hipocotilo a los 21 dpi (RQ = 5,52). Del mismo modo, para ninguno de los *loci* presumiblemente regulados por FTF2 existió expresión en plantas inoculadas con la estirpe mutante; sin embargo, se observó una inducción significativa en la expresión de los mismos en plantas inoculadas con la estirpe silvestre, inducción que se produjo de forma específica en sistema radicular para el *locus* FOXG_02746 (codificador para una hidrofobina de tipo II) y en cuello de raíz para los *loci* FOXG_14730 (codificador para una proteína con dominio SET) y FOXG_14731 (codificador para una oxigenasa).

Estudios recientes de transcriptómica comparada con mutantes que expresan de forma constitutiva *FTF2* han identificado algunos genes codificadores para proteínas de tipo efector como candidatos a estar regulados por este factor de transcripción (van der Does *et al.*, 2016). Con el objetivo de conocer el patrón de expresión de estos genes en nuestro sistema de trabajo, se evaluó la expresión de genes codificadores para los efectores SIX1 y SIX6 en las mismas regiones de las plantas inoculadas y en los mismos tiempos descritos previamente. En la Figura 62 se muestran los resultados de expresión obtenidos para los dos genes en las plantas inoculadas con la estirpe silvestre y la mutante.

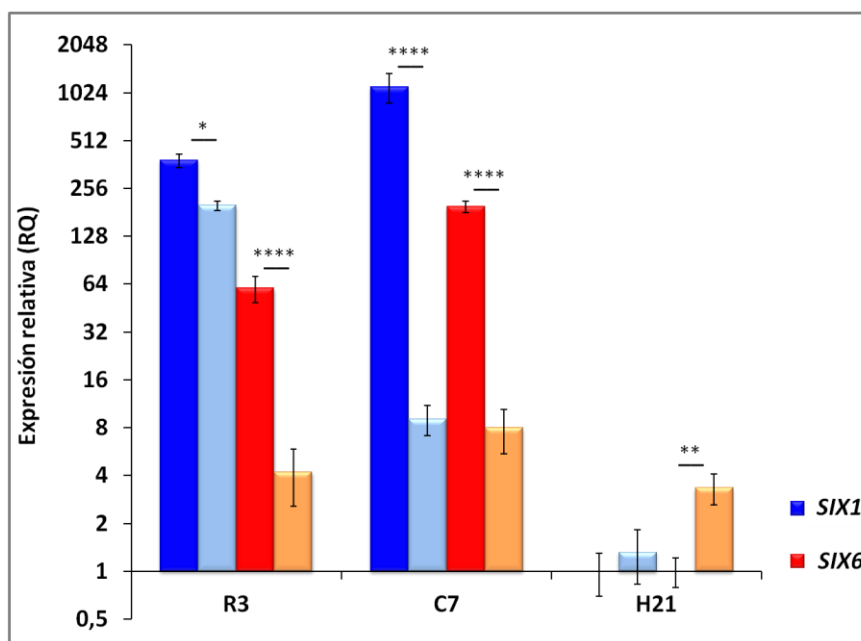


Figura 62. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes *SIX1* y *SIX6* en plantas colonizadas por las estirpes silvestre FOP-SP1 y mutante FOP-SP1ΔFTF2. Se evaluó la expresión en sistema radicular a 3 dpi (R3), cuello de raíz a 7 dpi (C7) e hipocotilo a 21 dpi (H21). Las medidas de expresión relativa (RQ) se indican en escala logarítmica en base 2. Las barras oscuras para cada color representan la expresión de cada gen en plantas colonizadas por la estirpe silvestre FOP-SP1; las barras claras, en plantas colonizadas por la estirpe FOP-SP1ΔFTF2. Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen de *EF1α* de *F. oxysporum* como gen endógeno. Las medidas se referenciaron al valor de expresión obtenido en hipocotilo de plantas inoculadas con la estirpe silvestre a 21 dpi (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre se evaluaron mediante un análisis t-test y se identifican como * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y **** ($P < 0,0001$).

La expresión del gen *SIX1* presentó una reducción estadísticamente significativa en sistema radicular y cuello de raíz de plantas inoculadas con la estirpe mutante FOP-SP1ΔFTF2 (199,7 para sistema radicular; 9,1 para cuello de raíz) respecto a la expresión cuantificada en las mismas regiones de plantas inoculadas con la estirpe silvestre FOP-SP1 (383,9 para sistema radicular; 1.113,7 para cuello de raíz); en hipocotilo no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen.

Para el gen *SIX6* en sistema radicular y cuello de raíz se observó el mismo patrón de expresión con una reducción significativa en la expresión en plantas inoculadas con la estirpe FOP-SP1ΔFTF2 respecto a la expresión de plantas inoculadas con la estirpe silvestre (4,2 en sistema radicular y 7,96 en cuello de raíz para FOP-SP1ΔFTF2; 60,3 en sistema radicular y 196,7 en cuello de raíz para FOP-SP1); en

hipocotilo en este caso existió un incremento significativo en la expresión del gen en plantas inoculadas con la estirpe FOP-SP1 Δ FTF2 (3,4) respecto de la expresión observada en plantas inoculadas con FOP-SP1 (1,0).

Finalmente, en las mismas regiones de plantas inoculadas con la estirpe silvestre o con la estirpe mutante y en los mismos tiempos indicados anteriormente en este apartado, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de un grupo de genes fúngicos cuyo papel en patogenicidad y/o virulencia ha sido demostrado. Así se evaluó la expresión de los genes *FNR1* (necesario para la utilización de fuentes de nitrógeno) (Divon *et al.*, 2006), *RHR1* (necesario en la utilización de ramnosa como fuente de carbono) (Pardo y Orejas, 2014) y *PacC* (regulador de la expresión de genes alcalinos) (Caracuel *et al.*, 2003). Sólo se obtuvo amplificación para el último, los resultados se presentan en la Figura 63.

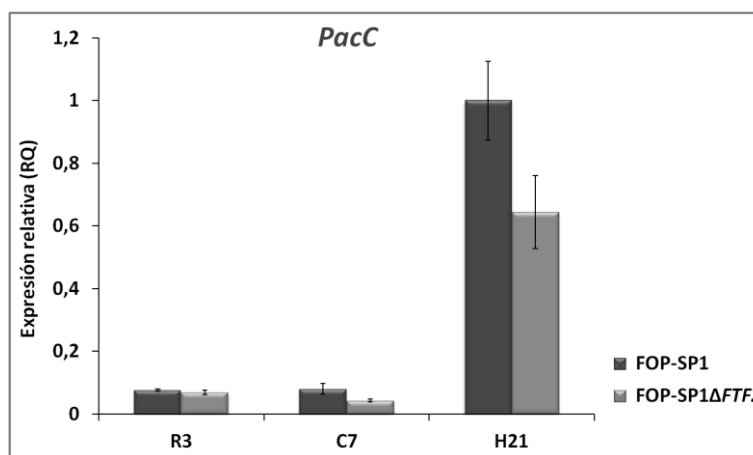


Figura 63. Análisis de expresión por RT-qPCR de *PacC* en plantas colonizadas por las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP1 Δ FTF2. Se evaluó la expresión en sistema radicular a 3 dpi (R3), cuello de raíz a 7 dpi (C7) e hipocotilo a 21 dpi (H21). Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen de *EF1 α* de *F. oxysporum* como gen endógeno. Las medidas se referenciaron al valor de expresión obtenido en hipocotilo de plantas inoculadas con la estirpe silvestre a 21 dpi (valor arbitrario de 1,0). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos biológicos independientes.

En tiempos tempranos de la infección (sistema radicular a 3 dpi y cuello de raíz a 7 dpi) no se observó expresión del gen ni en plantas inoculadas con la estirpe silvestre ni en plantas inoculadas con la estirpe mutante; en tiempos avanzados de la infección se observó una reducción en la expresión del gen en plantas inoculadas con la estirpe mutante (RQ = 0,64) respecto a la expresión en plantas inoculadas con FOP-SP1 (RQ = 1,0), reducción que no fue significativa según el análisis *t*-test realizado.

Interrupción génica de homólogos a *FTF2* en *Ustilago maydis*

Los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha por nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia de homólogos de *FTF2* en un amplio rango de hongos ascomicetos filamentosos (Niño-Sánchez *et al.*, 2016); sin embargo, el estudio filogenético en otros grupos fúngicos no se ha llevado a cabo de una forma tan exhaustiva.

En este trabajo nos propusimos completar el estudio filogenético haciéndolo extensivo al grupo de hongos basidiomicetos, en particular al hongo *Ustilago maydis*, agente causal del carbón del maíz (Kahmann *et al.*, 2000), con el objetivo de obtener mutantes interrumpidos en los candidatos homólogos que confirmasen la función desempeñada por *FTF2* en hongos fitopatógenos. Para ello se realizó un análisis de homología de secuencias aminoacídicas entre la secuencia de *FTF2* del hongo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* y la secuencia de referencia del hongo *U. maydis* depositada en la base de datos *Join Genome Institute*. El análisis *BLASTP* realizado no reveló la existencia de proteínas de *U. maydis* con una homología lo suficientemente elevada como para ser considerada homóloga de *FTF2*, siendo las tres proteínas con mayor porcentaje de identidad las siguientes:

- **UMAG_04806**: 40,7% de identidad; proteína hipotética no caracterizada.
- **UMAG_00113**: 34,4% de identidad; proteína relacionada con el activador transcripcional acu-15.
- **UMAG_01556**: 39,6% de identidad; proteína relacionada con el activador transcripcional Mut3p.

Las diferencias existentes entre ambos grupos fúngicos, tanto a nivel fisiológico como a nivel evolutivo, hacían suponer que las homologías halladas no serían del 100%; sin embargo, los datos aportados por el análisis de homología se quedaron muy lejos de un nivel mínimo de homología que nos hiciese presuponer a las proteínas como candidatas homólogas de *FTF2*. Debido a esto se decidió no continuar con la consecución de los mutantes de *U. maydis* interrumpidos en estos genes.

3.- DISCUSIÓN

Los trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* han permitido identificar y caracterizar la familia génica *FTF* (*Fusarium Transcription Factor*) codificante para factores de transcripción que presentan dominio de unión a ADN de tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Se considera que la familia *FTF* es una familia génica en expansión que presenta miembros tanto en el genoma central del hongo como en las regiones de linaje específico (LS) o genoma adaptativo. *FTF2* (*Fusarium Transcription Factor 2*) es un gen de copia única altamente conservado en ascomicetos filamentosos presente en el genoma central de *F. oxysporum*. La búsqueda de homólogos de *FTF2* en el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* realizada en el presente trabajo confirmaron los resultados obtenidos con anterioridad en nuestro grupo de investigación que situaban a *FTF2* exclusivamente dentro del grupo de ascomicetos (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Por su parte, *FTF1* (*Fusarium Transcription Factor 1*) es un gen presente en un número variable de copias exclusivo de estirpes muy virulentas del complejo de especies *F. oxysporum* y ubicado en las regiones LS del genoma (Niño-Sánchez *et al.*, 2016).

Los análisis *in silico* realizados comparando la secuencia nucleotídica de *FTF1* y *FTF2* mostraron un grado de homología del 55-65% en la región promotora y del 80-85% en la región codificante (Ramos, 2005). A pesar del alto grado de homología, este análisis permitió identificar diferencias en el tipo de secuencias de reconocimiento para proteínas reguladoras presentes en sus regiones promotoras que sugieren una regulación diferente en los dos genes y que, probablemente, sean determinantes para explicar las diferencias observadas en los niveles y el momento de expresión para ambos (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). De igual forma se ha encontrado un alto grado de homología en las secuencias aminoacídicas (83-89%) que se traduce en una distribución pareja de dominios en la proteína. Ambos factores de transcripción presentan un dominio de unión al ADN de tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$ formado por 39 residuos aminoacídicos y localizado próximo al extremo amino de la proteína. La presencia de este dominio permite incluir a *FTF2* y *FTF1* dentro de la clase de factores de transcripción conocidos como *zinc cluster proteins*

(MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling y Holmberg, 1996). Del mismo modo que ocurre con la mayoría de factores de transcripción de esta clase, FTF2 y FTF1 presentan un dominio de mediana homología (MHR) localizado a 195-196 residuos del extremo carboxilo del dominio dedo de zinc binuclear. El modelado tridimensional de este dominio, formado por 103 aminoácidos en el caso de FTF2 y por 95 en FTF1, permitió identificar una α -hélice exclusiva de FTF2 cuya secuencia codificante se diferencia en tres residuos entre una y otra proteína. Es conocida la función reguladora de la expresión génica que ejerce el dominio dedo de zinc binuclear en factores de transcripción de esta familia gracias a su unión a secuencias específicas en regiones promotoras de un grupo variable de genes. En reguladores de este tipo presentes en hongos levaduriformes como *Saccharomyces cerevisiae* (Gal4, Put3p, Ppr1) se ha descrito que el dominio MHR es el encargado de regular la especificidad de unión del dominio dedo de zinc binuclear a unas regiones promotoras y no a otras, y es precisamente esta especificidad la que determina finalmente el tipo de ruta metabólica en la que participa cada uno de estos factores de transcripción (MacPherson *et al.*, 2006; Schjerling y Holmberg, 1996). Sabiendo que el dominio MHR actúa como regulador transcripcional de estos factores de transcripción, la presencia de una α -hélice en FTF2 y no en FTF1 sugiere que, probablemente, la especificidad de unión de FTF2 a ciertas dianas recaiga en esa estructura secundaria de la proteína. Estudios recientes han propuesto que los parálogos de *FTF1* surgen por duplicación y divergencia de la copia ancestral del gen *FTF2* en el linaje de *F. oxysporum*, debido a la actividad de los abundantes elementos transponibles ubicados en las regiones LS del genoma y a la posterior acumulación de mutaciones puntuales en las copias duplicadas, dando así lugar a los parálogos identificados hasta la fecha (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que la ausencia de la α -hélice en la estructura de FTF1 viene determinada por mutaciones puntuales en nucleótidos de los codones codificantes para tres aminoácidos, lo más probable es que estas mutaciones se correspondan con mutaciones puntuales ocurridas durante la divergencia que dio origen a los parálogos de FTF1 y que fueron seleccionadas por dotar a la proteína de una nueva función ventajosa para el hongo, aunque no se puede descartar que el efecto de la desaparición de dicha α -hélice derivase en la pérdida de alguna función de la proteína.

Siendo la duplicación génica y la divergencia de *FTF2* las explicaciones más plausibles para el origen de los parálogos de *FTF1*, es lógico pensar que ambos factores de transcripción puedan compartir algunas funciones en el hongo y que las copias de *FTF1* hayan perdido algunas o incluso hayan adquirido otras nuevas como resultado de la divergencia. Mientras se conoce que *FTF1* es un factor de virulencia regulador de la expresión de los genes codificadores para los efectores SIX durante el proceso de infección en el hongo (van der Does *et al.*, 2016; Niño-Sánchez *et al.*, 2016), no se tiene tan claro cuáles son las funciones en las que participa *FTF2*. Para esclarecer el papel que desempeña este factor de transcripción en la biología del hongo, se obtuvieron mutantes delecionados en *FTF2* en el hongo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

La caracterización fenotípica llevada a cabo durante el crecimiento saprofito de estirpes $\Delta FT F 2$ de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveló una reducción significativa en la producción de esporas en tiempos cortos de incubación en medio líquido, además de existir una elevada producción de esporas de tipo macroconidio en medio sólido respecto a la nula formación de éstas por parte de las estirpes silvestres correspondientes. Se ha descrito la formación de esporas de tipo macroconidio sobre el tejido vegetal muerto al finalizar el ciclo de infección (Leslie y Summerell, 2006). Los mutantes delecionados en el *locus* homólogo de *FTF2* (FGSG_05503) en *Fusarium graminearum* presentan ascosporas con morfología alterada respecto de la estirpe silvestre que se liberan en menor número que en ésta (Son *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* junto con los obtenidos en *F. graminearum* sugieren una participación de *FTF2* en los procesos de esporulación del hongo, afectando tanto al número de esporas producidas como a la morfología/clase de las mismas y el momento en el que se forman.

Por otro lado, el análisis de la capacidad de germinación de estirpes FOP-SP1 $\Delta FT F 2$ reveló que éstas presentan un incremento significativo en el porcentaje de esporas germinadas a las 4 hpi, porcentaje que acaba por equilibrarse 6 horas tras el inicio del ensayo; estos resultados indican que el proceso de germinación se encuentra adelantado en estas estirpes respecto a la estirpe silvestre. Se ha descrito este mismo fenotipo en mutantes nulos en *EBR1* (*Enhanced Branching*) en *F. graminearum* habiéndose propuesto que el factor de transcripción *EBR1* es uno de los componentes de la ruta de señalización mediada por GTPasas de tipo Ras actuando como regulador

negativo de la germinación (Zhao *et al.*, 2011). 800 pb aguas abajo del *locus* FOXG_09390 (*FTF2*) de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se localiza el *locus* FOXG_09392 que codifica para una proteína GTPasa pequeña de tipo Ras. Precisamente el análisis de transcriptómica comparada (*RNAseq*) llevado a cabo con estirpes $\Delta FTF2$ muestra una expresión diferencial para el *locus* FOXG_09392 que se encuentra drásticamente reducida en estas estirpes respecto a la estirpe silvestre. Si bien son necesarios estudios adicionales para afirmar con certeza que *FTF2* es un componente de la vía de señalización que controla la germinación, el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo demuestran que *FTF2* regula la actividad de una proteína GTPasa de tipo Ras (FOXG_09392), proteínas que se han relacionado con la regulación del proceso de germinación en hongos (Bluhm *et al.*, 2007).

Los mutantes silenciados en la familia génica *FTF* al completo y los mutantes con expresión constitutiva de un parálogo funcional de *FTF1* obtenidos en nuestro grupo de investigación no presentan cambios ni en la esporulación ni en el proceso de germinación (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), por lo que parece que es *FTF2* de manera específica el que está involucrado en ambos procesos y *FTF1* no participa en la regulación de los mismos. Esto sería lógico si tenemos en cuenta que la copia de *FTF2* se ubica en el genoma central donde se localizan *loci* conservados que codifican para proteínas necesarias en procesos básicos de la biología del hongo (Ma *et al.*, 2010; Vlaardingerbroek *et al.*, 2016), mientras que los parálogos de *FTF1* se distribuyen en regiones del genoma menos conservadas y expuestas a una mayor tasa de mutación (Vlaardingerbroek *et al.*, 2016).

Como se indicó anteriormente, el origen por duplicación y divergencia de *FTF2* propuesto para los parálogos de *FTF1* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016) sugiere que los dos reguladores comparten ciertas funciones. Se investigó si dichas funciones podrían afectar a la capacidad patogénica y/o virulencia del hongo, sabiendo por estudios previos que *FTF1* es un regulador de virulencia en *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2007). Para ello se realizaron ensayos de infección sobre plantas de judía común con estirpes FOP-SP1 $\Delta FTF2$. Estos mutantes presentaron una reducción significativa en el grado de virulencia cuando se inocularon sobre su hospedador. La sintomatología observada en las plantas recuerda a la descrita anteriormente para

plantas inoculadas con estirpes patógenas poco virulentas (Alves-Santos *et al.*, 2002); sin embargo, plantas inoculadas con estirpes silenciadas en la familia génica *FTF* muestran una reducción en la sintomatología de fusariosis aún más acusada (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), y por otro lado el silenciamiento génico de *FTF1* inducido por plantas de banana (*Musa* spp.) sobre *F. oxysporum* f. sp. *ubense* determina una ausencia completa de síntomas de fusariosis (Ghag *et al.*, 2014). Por ello se ha propuesto que, si bien ambos reguladores son necesarios para la virulencia del hongo, el papel fundamental en este sentido recae en *FTF1* y la aportación por parte de *FTF2* es menor (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Las estirpes delecionadas en el homólogo de *FTF2* en *F. graminearum*, aunque al igual que las estirpes FOP-SP Δ *FTF2* muestran alteraciones en conidiación, no presentan alteración en su grado de virulencia (Son *et al.*, 2011). En *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se ha correlacionado el número de copias de la familia génica presentes en el genoma con el grado de virulencia del hongo (de Vega-Bartol *et al.*, 2011). *F. graminearum* no presenta parálogos de *FTF1* en su genoma, mientras que la estirpe muy virulenta FOP-SP1 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* presenta cuatro, por lo que a la vista de nuestros resultados se puede plantear que probablemente la ganancia de parálogos de *FTF1* haya permitido lograr un incremento en el grado de virulencia de las estirpes.

El análisis de la capacidad de colonización de estirpes FOP-SP1 Δ *FTF2* sobre plantas de judía común mediante microscopía láser confocal confirmó que estas estirpes se comportan como patógenos poco virulentos que muestran un retraso en la penetración y colonización en sistema radicular, con un patrón de colonización en cuello de raíz e hipocotilo que recuerda al descrito para la estirpe poco virulenta FOP-SP4 (Niño-Sánchez *et al.*, 2015) y para estirpes silenciadas en la familia génica *FTF* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016), colonizando mayoritariamente el tejido parenquimático de la planta con sólo algunos haces xilemáticos ocluidos por el crecimiento del hongo. A pesar del retraso en penetración y colonización en las primeras fases de la infección por parte de las estirpes delecionadas, no se observó una reducción en la acumulación de micelio en muestras de sistema radicular, lo que sugiere que el retraso en la penetración no es debido a un menor crecimiento del hongo sino a la participación de *FTF2* en el mecanismo o mecanismos que regulan esa penetración en el hospedador.

La sintomatología observada en plantas de judía común inoculadas con estirpes $\Delta FTF2$ indica la existencia de una resistencia a la infección por parte del hospedador que impide o atenúa el desarrollo de la fusariosis vascular. La interacción planta-patógeno determina la activación de mecanismos locales y sistémicos de defensa por parte del hospedador que le permiten resistir al ataque del patógeno. Esta resistencia en el hospedador viene mediada por una compleja red que abarca desde el reconocimiento de elicitores/efectores del propio patógeno hasta la activación de vías de señalización mediadas por fitohormonas (Berrocal-Lobo y Molina, 2008; Jones y Dangl, 2006; Newman *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2012; Thomma *et al.*, 2001). En este sentido, los estudios realizados en la interacción *Arabidopsis thaliana* - *F. oxysporum* han permitido identificar ciertos componentes de las rutas de señalización mediadas por ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico implicados en la resistencia al hongo. Algunos genes codificadores para proteínas relacionadas con la patogénesis (*PR*), componentes de la vía defensiva mediada por ácido salicílico, y ciertos genes codificadores para proteínas de respuesta a etileno (*ERF*), componentes de la ruta defensiva mediada por etileno/ácido jasmónico, se encuentran inducidos durante la interacción planta-patógeno determinando resistencia en el hospedador (Berrocal-Lobo y Molina, 2008). Las plantas de judía común (*P. vulgaris* L.) inoculadas con mutantes FOP-SP1 $\Delta FTF2$ presentaron una inducción significativa en la expresión del gen *PR1* en etapas tempranas de la infección respecto a los niveles de expresión observados para las plantas inoculadas con la estirpe silvestre. Resultados similares se han descrito previamente para la interacción entre *P. vulgaris* L. y estirpes poco virulentas de la misma forma especial de *F. oxysporum* frente a la interacción con estirpes muy virulentas (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Estos resultados, en su conjunto, sugieren que los elementos regulados por el factor de transcripción FTF2 forman parte del mecanismo de enmascaramiento de *F. oxysporum* para evitar el reconocimiento por el hospedador.

El análisis de *RNA-seq* presentado en este Capítulo se llevó a cabo con mutantes $\Delta FTF2$ (FOP-SP4 $\Delta FTF2$) cuyo fondo genético está libre de parálogos *FTF1* lo que nos permitió identificar genes presumiblemente regulados de forma independiente por FTF2. Consideramos que la aproximación experimental utilizada en este trabajo presenta ventajas sobre la empleada recientemente por van de Does y

colaboradores (van der Does *et al.*, 2016) quienes basaron su estudio transcriptómico en estirpes mutantes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que expresan de forma constitutiva *FTF2*, pero también poseen los parálogos *FTF1*. En nuestro caso, el análisis mostró una drástica reducción en la expresión de dos genes codificadores para proteínas hidrofobina de tipo II en las estirpes FOP-SP4 Δ *FTF2* respecto a la estirpe silvestre. Las hidrofobinas son proteínas exclusivas del reino Fungi que recubren la superficie de esporas e hifas del hongo (Bayry *et al.*, 2012) y que se han demostrado necesarias para la patogenicidad del hongo *Magnaporthe grisea* (Kim *et al.*, 2005). Se sabe que los componentes de la pared celular del hongo son reconocidos por el hospedador actuando como elicitores de la respuesta defensiva en éste (Jones y Dangl, 2006; Newman *et al.*, 2013), y que el patógeno los enmascara con una cubierta externa hidrofóbica (Bayry *et al.*, 2012). La inducción de forma específica durante la colonización del sistema radicular de uno de los genes codificadores para hidrofobinas (FOXG_02746) identificado en el análisis transcriptómico con mutantes Δ *FTF2* y el retraso en la colonización observado para estos mutantes, permiten situar a *FTF2* en un posible modelo de regulación del reconocimiento del patógeno por el hospedador durante el proceso de infección (Figura 64). En este modelo *FTF2* actuaría como activador de un gen codificador para una hidrofobina contribuyendo así al enmascaramiento del patógeno, lo cual le permitiría evadir, al menos parcialmente, la respuesta defensiva del hospedador.

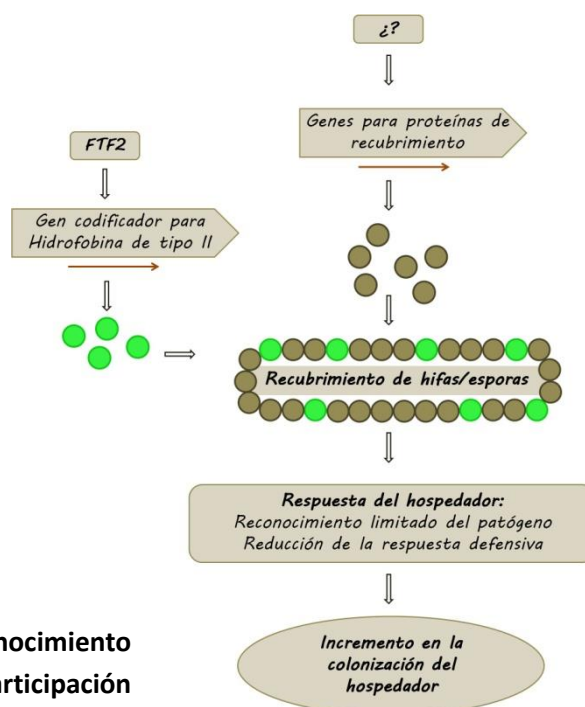


Figura 64. Modelo de regulación del reconocimiento de *F. oxysporum* por el hospedador con participación de FTF2.

Los análisis de transcriptómica comparada realizados recientemente en mutantes de expresión constitutiva de *FTF2* (van der Does *et al.*, 2016) han dado indicios acerca de genes sometidos a una presumible regulación por *FTF2*, incluyendo en ese grupo a genes codificadores para los efectores *SIX1* y *SIX6*. En mutantes *FOP-SP1ΔFTF2* (este trabajo) y en mutantes *FOP-SP1FTFRNAi* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016) existe una reducción parcial de la expresión de los genes *SIX1* y *SIX6* (cuyos *loci* están presentes en el genoma de la forma especial *phaseoli*; Niño-Sánchez, J., comunicación personal) durante el proceso de infección del hospedador; por su parte, estirpes de expresión constitutiva de *FTF1* en la forma especial *phaseoli* muestran una inducción de estos genes durante el cultivo en medio líquido (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Por lo tanto, se puede concluir que existe una regulación conjunta de los genes codificadores para los efectores *SIX1* y *SIX6* por parte de *FTF2* y los parálogos *FTF1*. Si bien queda por demostrar experimentalmente si esa regulación se produce en el mismo momento del proceso de infección o es secuencial para *FTF1* y *FTF2*, los resultados obtenidos hasta el momento por nuestro grupo de investigación nos permiten proponer un modelo de regulación para estos efectores y otros posibles efectores vasculares, por ahora no identificados (Figura 65). El conjunto de efectores secretados en el sistema vascular de la planta, denominados aquí VCE (Efectores de colonización vascular, *Vascular Colonization Effectors*) y que incluye a los efectores *SIX*, se secretaría en las distintas

regiones del hospedador de forma acumulativa con el incremento de expresión de las copias *FTF*. De esta forma la expresión de *FTF2* permitiría la acumulación de diversos VCE durante todo el proceso de colonización del huésped, pero los niveles no serían suficientes para permitir una colonización vascular que implique un alto grado de virulencia en el hongo; sin embargo, el incremento en los niveles de expresión de la familia *FTF* con el comienzo de expresión de los parálogos de *FTF1* durante la colonización del cuello de raíz, contribuiría a una acumulación creciente de VCE que derivaría en una mayor colonización vascular, imprescindible para el incremento de virulencia del hongo.

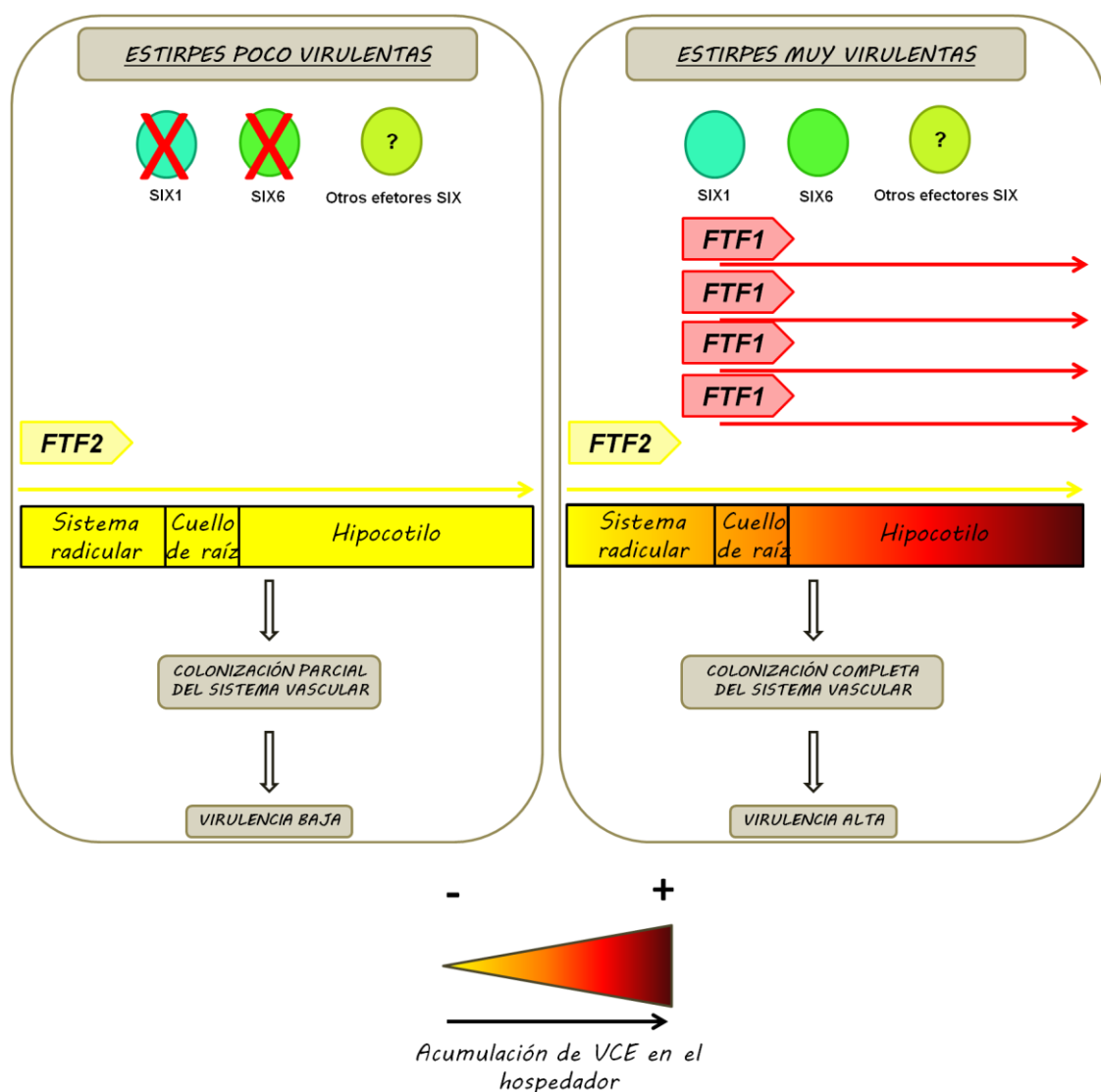


Figura 65. Modelo de regulación de efectores de colonización vascular (VCE) en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* por la familia de factores de transcripción *FTF*. Modelo de regulación en estirpes poco virulentas (izquierda) y en estirpes muy virulentas (derecha). Las flechas de color amarillo (*FTF2*) y rojo (*FTF1*) identifican expresión de los *loci* correspondientes indicados inmediatamente por encima de cada una de ellas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1.- La disponibilidad de la fuente de carbono en el medio es un factor importante que influye en la expresión de genes ácidos y alcalinos mediante la modulación del pH ambiental. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* secreta amonio durante su crecimiento en medio de cultivo con una concentración baja de sacarosa, y cantidades modestas de ácido glucónico en medio de cultivo con una concentración alta de sacarosa. La secreción de amonio incrementa el pH ambiental, mientras que la secreción de ácido glucónico no tiene ningún efecto. El balance amonio/ácido orgánico modula la expresión de *PacC* y de los genes regulados por este factor de transcripción.

2.- FTF2 (*Fusarium Transcription Factor 2*) es necesario para la completa virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en plantas de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) aunque su aportación es menor que la de sus parálogos FTF1 (*Fusarium Transcription Factor 1*). Según el patrón de colonización observado para estirpes FOP-SP1 Δ FTF2, FTF2 es necesario para la penetración y colonización del sistema radicular del hospedador.

3.- FTF2 activa la expresión de un gen codificador para una hidrofobina de tipo II (FOXG_02746) que se muestra inducido *in planta*. Esta hidrofobina es un componente de la cubierta hidrofóbica de las esporas evitando el reconocimiento por el hospedador y, por tanto, facilitando la colonización de éste.

4.- Los miembros de la familia génica *FTF* inducen la expresión de los genes *SIX*, los cuales codifican efectores necesarios para la virulencia del hongo.

CONCLUSIONS

1.- Carbon availability in the environment is an important factor triggering the expression of acid/alkaline genes via modulation of environmental pH. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* secretes ammonia in low-sucrose medium and modest quantities of gluconic acid in high-sucrose medium. The secretion of ammonia increases environmental pH, while gluconic acid secretion has no effect. The balance ammonia/organic acid modulates the expression of *PacC* and those genes regulated by this transcription factor.

2.- FTF2 (Fusarium Transcription Factor 2) is required for full virulence of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* on common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) although to a lesser extent than the FTF1 paralogues (Fusarium Transcription Factor 1). According to the colonization pattern shown by FOP-SP1 Δ FTF2 mutant strains, FTF2 is required for root system penetration and colonization.

3.- FTF2 is a transcriptional activator of a type II hydrophobin encoding gene (FOXG_02746) which is overexpressed *in planta*. This hydrophobin has been shown to be a component of the rodlet-layer of spores, preventing host recognition and thus improving host colonization.

4.- The members of the *FTF* gene family induce the expression of *SIX* genes, which encode effectors that are required for fungal virulence.

APÉNDICES

APÉNDICE I

<i>Fusarium oxysporum</i>			
Cebador	Número de acceso	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
Inac-FTF2-O1	FOXG_09390 ^a	GGTCTTAAUGACAGCGACAACCCAAGCCAAAC	69,4
Inac-FTF2-O2	FOXG_09390 ^a	GGCATTAAUCCCTGCCCTGCGAGAGAGACAAG	71,8
Inac-FTF2-A3	FOXG_09390 ^a	GGACTTAAUATGAAGCCAACAGCGGAAGCC	66,7
Inac-FTF2-A4	FOXG_09390 ^a	GGGTTTAAUATATCCTGACCACCACCCAACCC	67,4
Inactivación-5'-Fwd	FOXG_09390 ^a	GACCAGACAAGCCAAGCCAAGACA	61,3
Inactivación-3'-Rev	FOXG_09390 ^a	GCCCGCCTTAGCAGTAGACCGC	62,8
Interno-qFTF2-5'-Fwd	FOXG_09390 ^a	CGCTGTGCCATCTCCCTCTCA	59,8
Interno-qFTF2-3'-Rev	FOXG_09390 ^a	CGTGGGCGTGGGCGTGAT	62,2
FTF2-Fwd	FOXG_09390 ^a	ATGCTCACACCCCCACATTCT	55,5
FTF2-Rev	FOXG_09390 ^a	ATCCCCAAAGACAAGCTGAC	54,5
FTF2-FWD-SouthernInact	FOXG_09390 ^a	GTCCACAGAAATGGGACGCTGCC	63,4
FTF2-REV-SouthernInact	FOXG_09390 ^a	AAAGGGCGATGGCTCGGATCA	62,3
F2B6	JN167165 ^b	ACGCCACGCCTCACAATCACC	64,7
F2M16A	JN167165 ^b	CGCCGCCTCCGAGTGGTGACC	68,2
Hph-F	pRF-HU ^c	GCGCTTCTGCGGGCGATTTG	64,4
Hph-R	pRF-HU ^c	CGGGTTCGGCCATTCGGAC	64,9
Hph-Ac	pRF-HU ^c	CGGGCAGTTCGGTTTCAGGC	61,2
Hph-Bc	pRF-HU ^c	CGTCTGGACCGATGGCTGTG	58,6
RF-1	pRF-HU ^c	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	62
RF-2	pRF-HU ^c	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	61,9
M18B	DQ28013 ^b	CGCCAAAACGCAAGCTCACTTC	60,7

M19A	DQ28013 ^b	GCGAGGGGTGCCGAAACAAAGC	65,3
B310	DQ280313 ^b	CAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTC	64
M18A	DQ280313 ^b	GAAGTTGAGCTTCGTTTTGGCG	57,8
FTF1-Fwd	DQ280313 ^b	TGTGGTGGCCAGGATATGATG	55,4
FTF1-Rev	DQ280313 ^b	TCGATGCCTGCCTTGACAT	53,7
EF1alpha-Fwd	FOXG_03515 ^a	CATCGGCCACGTCTGACTCT	55,7
EF1alpha-Rev	FOXG_03515 ^a	AGAACCCAGGCGTACTTGAA	51,4
SGE1-Fwd	FOXG_10510 ^b	CAGCCGTATCCTTGCAACTA	54,4
SGE1-Rev	FOXG_10510 ^b	TGGTTGACTTGCCGTTCTT	54,5
FNR1-Fwd	DQ387858 ^b	CCAGCAGTTCATGTATGGTGGCG	61
FNR1-Rev	DQ387858 ^b	CACCTGAGAGGGGTCGATATGCC	60,5
PACC-Fwd	AY125958 ^b	CATGGCAACCTCTCCGTTCCC	60,1
PACC-Rev	AY125958 ^b	GGGCAGGTAGTATTGCTGAGCCG	60,8
RHR1-Fwd	FOXG_05541 ^a	CCATGCTGAGATTCTCCACGGC	60,4
RHR1-Rev	FOXG_05541 ^a	CATGACAGGATCGGTTTGGGGTG	61,9
SIX1-Fwd	AJ608702 ^b	GAGCCGCCTCAATCGCCTG	60,2
SIX1-Rev	AJ608702 ^b	GGCCAAGTTGCGCGATATGTG	59,9
SIX6-Fwd	ACY39286,1 ^b	GCTTTTGCCTGGCGAACCC	60
SIX6-Rev	ACY39286,1 ^b	TTTTCCCGTTGCTGAGATTGCG	60,9
14731-Fwd	FOXG_14731 ^a	TCGTCATATCGCCAGGGGTG	57,9
14731-Rev	FOXG_14731 ^a	CAACGTATCGTGAGCCCCGA	58,1
02748-Fwd	FOXG_02748 ^a	GATCCTTGCCCCGACAGTCT	55,3
02748-Rev	FOXG_02748 ^a	GCGCAGATGGCTTGGAAGTT	56,6
02746-Fwd	FOXG_02746 ^a	TCTTCGGAAACCCCAAGTGC	58,5
02746-Rev	FOXG_02746 ^a	CCTTCTGGCCAGACTCGGC	57
14730-Fwd	FOXG_14730 ^a	CGTCATATCGCCAGGGGTGA	57,9

14730-Rev	FOXG_14730 ^a	TCAACGTATCGTGAGCCCCG	58,1
08907-Fwd	FOXG_08907 ^a	CATCAAGCGTCGTTCTGCCTTGG	62,5
08907-Rev	FOXG_08907 ^a	TGGGTCTTATTATGGTCCGTGTTGAGC	62
04430-Fwd	FOXG_04430 ^a	CCAAGACCGCAAGGGTAACATGCT	62
04430-Rev	FOXG_04430 ^a	TCGAACTTGAAGGGATAGGATGTCCG	62,3
13421-Fwd	FOXG_13421 ^a	GCCTGGGAGACTGACAACCCTGG	62,6
13421-Rev	FOXG_13421 ^a	TGTTAGCAATCTCACTTGAACGCTCGA	62
13497-Fwd	FOXG_13497 ^a	TGTCTCCGAGGAGCATAAGGAAGTCG	62,6
13497-Rev	FOXG_13497 ^a	TTGGAGTCCAGACAGAGAAGTGAGGCT	61,7
FOXG_04395Fwd	FOXG_04395 ^a	TCCGCCAACATCACCCAGCC	62,4
FOXG_04395Rev	FOXG_04395 ^a	GACGAGATACCGACCTGAGCCTTG	60
FOXG_13111Fwd	FOXG_13111 ^a	GGAGCTGTGACGACGAAGCCTACT	59,8
FOXG_13111Rev	FOXG_13111 ^a	CGCCACCACACTGCCCATACC	61,8
FOXG_03899Fwd	FOXG_03899 ^a	GGCATAGACAGCGGCTTGACCA	60,9
FOXG_03899Rev	FOXG_03899 ^a	GGCATACTACTACACATCTCACCCAGCG	61,9
FOXG_09503Fwd	FOXG_09503 ^a	GTCTGCGAGGGCTTGAAGCG	59,6
FOXG_09503Rev	FOXG_09503 ^a	GCTCGGAGGTTGGAGCCAGACTT	61,7
FOXG_10952Fwd	FOXG_10952 ^a	CAGGATGGAGTAAAGCTCGTCATTCC	60,2
FOXG_10952Rev	FOXG_10952 ^a	TTGAACTGAGGGCGGGATGAC	59,8
FOXG_07472Fwd	FOXG_07472 ^a	CACTGTGCCAAGGATGAGGGCT	60
FOXG_07472Rev	FOXG_07472 ^a	GTACGAGTCATCGGTCTGCTGCTTTG	62
FOXG_13892Fwd	FOXG_13892 ^a	CTGCTGTCGGGAGCTTCTCCAC	59,8
FOXG_13892Rev	FOXG_13892 ^a	GAGCTTCCAGTGTCGAAGATGAGCC	61,3
FOXG_02432Fwd	FOXG_02432 ^a	CCAGCCCAGCGATGGAAGAC	59,1
FOXG_02432Rev	FOXG_02432 ^a	GTGCGTAATATGCCAAGGCGTCAT	60,9
FOXG_05286Fwd	FOXG_05286 ^a	CGACAGTGCAGGCTCAATCGC	60,3

FOXG_05286Rev	FOXG_05286 ^a	GAGTCAACGCACCACCAACGATAG	59,4
FOXG_00249Fwd	FOXG_00249 ^a	GGTCCCGTCATTACGAGGCTT	61
FOXG_00249Rev	FOXG_00249 ^a	CGTACTTTCCACCGACAACGAGCT	60,4
FOXG_16878Fwd	FOXG_16878 ^a	CTCTGATGGACACGACACTTCGGT	59,1
FOXG_16878Rev	FOXG_16878 ^a	GCGTAGGTCTCGTTCTCATCCCAT	59,4
FOXG_09820Fwd	FOXG_09820 ^a	GTCAATGCCCTCTGGCTGACAAG	59,6
FOXG_09820Rev	FOXG_09820 ^a	GCTCGGGACCCTTGAGACCATAGT	60,5
FOXG_10481Fwd	FOXG_10481 ^a	CGGGCTGCAAGATTGTGTCTCTC	59,7
FOXG_10481Rev	FOXG_10481 ^a	CCAGGATGGTGCTGCCAACG	60,8
FOXG_00950Fwd	FOXG_00950 ^a	GCAACTGGTGGAGGTGGTCCTG	60,2
FOXG_00950Rev	FOXG_00950 ^a	ACCTTTGTGCGAGTTCTGAACCG	59,2
FOXG_13051Fwd	FOXG_13051 ^a	AGACCACTTTCGGCTATGCTGAGTG	59,7
FOXG_13051Rev	FOXG_13051 ^a	CCACCATCTTTACCCTCGCAGTC	59,9
FOXG_15423Fwd	FOXG_15423 ^a	CGGAACATACTGGCATCGGC	61
FOXG_15423Rev	FOXG_15423 ^a	GAAGAAGAGGATCAAAGCGGCGAG	61,4
FOXG_05948Fwd	FOXG_05948 ^a	GTGCCGCTGGTGCTTCTCTTGA	61,2
FOXG_05948Rev	FOXG_05948 ^a	GTGGACTTCTGGATACCGATGGCA	60,9
FOXG_13640Fwd	FOXG_13640 ^a	GTCCGCCATGCTTGCAGCAG	61,2
FOXG_13640Rev	FOXG_13640 ^a	GCTTAGCCTGTGTCGTCCATACGG	60,7
FOXG_09221Fwd	FOXG_09221 ^a	CGTTTCTCTGTCCTCGCTACCTGC	60,2
FOXG_09221Rev	FOXG_09221 ^a	CGTCGAAAGTGAGGGCGATGTT	60
FOXG_00122Fwd	FOXG_00122 ^a	CGGTGTCGTCGGAGTCTCCCA	61,7
FOXG_00122Rev	FOXG_00122 ^a	ATTTGCACCACATTCGCTTCG	60,8
FOXG_11202Fwd	FOXG_11202 ^a	CGCCATTGCTACCATCTTTCTTGG	60,6
FOXG_11202Rev	FOXG_11202 ^a	AGAAGCCTGAAGAGCAGCACCAAC	59,9
FOXG_11678Fwd	FOXG_11678 ^a	GTGGAAATCCGCAGAAAGACGC	59,6

FOXG_11678Rev	FOXG_11678 ^a	CCCAAGGCACCGTCGTAGTAGAGC	61,9
FOXG_12141Fwd	FOXG_12141 ^a	CGCTTGGGTTCTGCTCGGATAT	59,1
FOXG_12141Rev	FOXG_12141 ^a	GTCCTGCGATGATACCGCTGC	59,2
FOXG_11739Fwd	FOXG_11739 ^a	GCAAGTTGACAGGCAGCGATAGAGTT	60,9
FOXG_11739Rev	FOXG_11739 ^a	GACGCACATAGAAGCCAACACCAG	59,6
FOXG_07597Fwd	FOXG_07597 ^a	CGAGGACGATGACGAGACTGCC	60,6
FOXG_07597Rev	FOXG_07597 ^a	CGTTGGACATGCCACCCTTCTTG	62,2
FOXG_17180Fwd	FOXG_17180 ^a	TTGGTGCTACGCACTTTGGTCTCAT	60,7
FOXG_17180Rev	FOXG_17180 ^a	AGCAGCAGTCTCCTCATCGTCCAT	60,1

Phaseolus vulgaris

Cebador	Número de acceso	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
Actin-Fwd	Phvul.011G064500 ^d	GAAGTTCTCTTCCAACCATCC	49,4
Actin-Rev	Phvul.011G064500 ^d	TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	54,3
ERF1-Fwd	Phvul.007G127800 ^d	CCTGTTGGGCTCTGAAGAGGAAAC	59,2
ERF1-Rev	Phvul.007G127800 ^d	AGGACCAAGGTCTTCAAACACGAC	57,4
ERF2-Fwd	XM_003549886 ^e	GGGAAAGTTCGCGGCGGAG	61,3
ERF2-Rev	XM_003549886 ^e	CGGAGTTAACCTCAACGGAAAATTC	61
PR1-Fwd	Phvul.003G109100 ^d	CAGGCACTACACTCAGGTTGTTTGGGA	60,3
PR1-Rev	Phvul.003G109100 ^d	TTGCCAGGAGGAGCATAGTTGCAA	61,6

Tabla 10. Listado de cebadores utilizados. (a) Locus en el genoma de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; (b) número de acceso en la base de datos *GenBank*; (c) plásmido; (d) locus en el genoma de *P. vulgaris*; (e) locus en el genoma de *Glicine max*.

APÉNDICE II

Código del <i>locus</i>	Función predicha de la proteína codificada	Expresión en FOP-SP4	Expresión en FOP-SP4 Δ FTF2
FOXG_08907	Dioxigenasa de la superfamilia SSF49482	534,751	0,0833733
FOXG_14731	2-oxoglutarato-Fe (II) oxigenasa de la superfamilia SSF51197	422,306	0,140394
FOXG_02748	Hidrofobina de tipo II de la superfamilia SSF101751	309,342	0,215962
FOXG_02746	Hidrofobina de tipo II de la superfamilia SSF101751	241,381	186,983
FOXG_04430	Dioxigenasa del catabolismo de la taurina de la superfamilia SSF51197	301,389	0,352256
FOXG_02747	Proteína hipotética	610,469	0,956661
FOXG_14730	Proteína con dominio SET de la superfamilia SSF82199	397,986	0,630475
FOXG_14728	Ligasa y sintetasa dependiente de AMP	152,123	0,267532
FOXG_03913	Oxidorreductasa con cofactor molibdeno	130,484	0,305493
FOXG_18886	Transporte de aminoácidos	36,165	0,117043
FOXG_17383	Transportador de la familia MSF-1 (<i>Major Facilitator Superfamily</i>)	339,277	0,110495
FOXG_13221	2-oxoglutarato-Fe (II) oxigenasa	493,997	169,748
FOXG_13324	Citocromo P450 (actividad monoxigenasa)	148,757	0,590758
FOXG_13130	Lectina de tipo curculina (proteína de unión a manosa)	15,432	0,616464
FOXG_17390	Dehidrogenasa/reductasa de cadena corta	586,328	244,621
FOXG_10990	Carboxilesterasa (tipo B)	157,728	0,0769175
FOXG_11846	6-fosfogluconato dehidrogenasa	114,271	0,58281
FOXG_01253	Región de tipo EGF (<i>Epidermal Growth Factor</i>), sitio conservado	141,324	0,737642
FOXG_13325	UbiA preniltransferasa	603,395	0,323818
FOXG_01252	Factor von Willebrand tipo A (anquirina)	1130,94	653,653
FOXG_17391	Proteína ribosómica S2	28,641	0,166113
FOXG_04523	Cupina de tipo RmIC	353,224	0,208452

FOXG_13003	Proteína de unión a carbohidratos	215,406	0,129003
FOXG_04701	EXTLS2, α -1,4-N-acetilhexosaminil-transferasa	95,541	0,576013
FOXG_04105	Glicoproteínas de pared celular con repeticiones en tándem	260,223	158,134
FOXG_04181	Oxidorreductasa	945,031	580,394
FOXG_12080	Proteína hipotética	404,175	0,258206
FOXG_09102	Proteasa con dominio PA (<i>Protease-Associated</i>)	694,821	0,450057
FOXG_03723	Glicósido hidrolasa de la familia 17	36,337	23,646
FOXG_15681	Receptor TGF- β , región extracelular de tipo I/II	249,441	0,162503
FOXG_15354	Aldehído oxidasa y xantin-dehidrogenasa	141,132	0,0957937
FOXG_08301	Dominio de unión a carbohidratos de tipo WSC	113,594	0,803492
FOXG_02477	Dominio de unión a carbohidratos de tipo WSC	136,023	0,983157
FOXG_14663	Dehidrogenasa-reductasa de cadena corta	341,772	0,264689
FOXG_03915	Catalasa	397,076	0,316455
FOXG_12017	Proteína de la superfamilia SSF54427 de tipo NTF2	526,536	0,421066
FOXG_13421	Oxidasa de unión a cobre de la superfamilia SSF49503	144,921	0,125273
FOXG_13497	Monooxigenasa	401,644	0,580894
FOXG_09392	GTPasa de tipo Ras	993,169	223,68

Tabla 11. Loci presumiblemente regulados por FTF2. Las lecturas de ADNc obtenidas en el análisis de *RNAseq* se alinearon frente al genoma de referencia (estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). En la primera columna se indican los códigos de los *loci* anotados en la base de datos *Joint Genome Institute* (JGI); en la segunda se describe la función predicha en la base de datos *InterPro* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) para cada *locus*; en las dos últimas columnas se muestran los niveles de expresión indicados por el análisis *RNAseq* para FOP-SP4 (tercera columna) y para FOP-SP4 Δ FTF2 (cuarta columna).

REFERENCIAS

- Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.-J., Schmelz, E.A., and Solano, R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1665–1681.
- Afanador, L.K., Haley, S.D., and Kelly, J.D.** (1993). Adoption of a “mini-prep” DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Michigan State University*.
- Agrios, G.** (2005). Plant pathology. *Academic Press*.
- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., and Olivain, C.** (2013). The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**, 918–926.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801.
- Alkan, N., Fluhr, R., Sherman, A., and Prusky, D.** (2008). Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**, 1058–1066.
- Alkan, N., Davydov, O., Sagi, M., Fluhr, R., and Prusky, D.** (2009). Ammonium secretion by *Colletotrichum coccodes* activates host NADPH oxidase activity enhancing host cell death and fungal virulence in tomato fruits. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **22**, 1484–1491.
- Alkan, N., Meng, X., Friedlander, G., Reuveni, E., Sukno, S., Sherman, A., Thon, M., Fluhr, R., and Prusky, D.** (2013). Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**, 1345–1358.
- Aloj, B., Marziano, F., Zoina, A., and Noviello, C.** (1987). Osservazione su una nuova razza fisiologica del *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Ann Fac Sci Agrar Univ Studi Napoli Portici* **21**, 51–55.
- Alves-Santos, F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P., and Díaz-Mínguez, J.M.** (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3335–3340.
- Alves-Santos, F.M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J.M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M.C., Díaz-Mínguez, J.M., and Eslava, A.P.** (2002a). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathol.* **51**, 605–611.

- Alves-Santos, F.M., Ramos, B., García-Sánchez, M.A., Eslava, A.P., and Díaz-Mínguez, J.M.** (2002b). A DNA-based procedure for *in planta* detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* **92**, 237–244.
- Appel, D.J., and Gordon, T.R.** (1995). Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Exp. Mycol.* **19**, 120–128.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K.** (1975). Reflections on the wilt Fusaria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 95–103.
- Arst Jr, H.N., and Peñalva, M.A.** (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* **19**, 224–231.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A., and Waalwijk, C.** (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90**, 891–900.
- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J., and Nash, C.** (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In *Colletotrichum* biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International, pp. 88–120.
- Barad, S., Horowitz, S.B., Moscovitz, O., Lichter, A., Sherman, A., and Prusky, D.** (2012). A *Penicillium expansum* glucose oxidase–encoding gene, *GOX2*, is essential for gluconic acid production and acidification during colonization of deciduous fruit. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**, 779–788.
- Barad, S., Horowitz, S.B., Kobilier, I., Sherman, A., and Prusky, D.** (2014). Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **27**, 66–77.
- Bateman, D.F., and Beer, S.V.** (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **55**, 204–211.
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M., and Latgé, J.-P.** (2012). Hydrophobins—unique fungal proteins. *PLOS Pathog* **8**, e1002700.
- Beckman, C.H.** (1987). The nature of wilt diseases of plants. *APS Press*.
- Benlloch, M., and Cañizo, J.** (1926). La enfermedad de las alubias en Barco de Ávila. *Bol Estac Patol Veg* **1**, 2–7.

- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A.** (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **17**, 763–770.
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A.** (2008). *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* **13**, 145–150.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R.** (2002). Constitutive expression of *ethylene-response-factor 1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**, 23–32.
- Bi, F., Barad, S., Ment, D., Luria, N., Dubey, A., Casado, V., Glam, N., Mínguez, J.D., Espeso, E., Fluhr, R., et al.** (2015). Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1178–1195.
- Bishop, C.D., and Cooper, R.M.** (1983a). An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 323–343.
- Bishop, C.D., and Cooper, R.M.** (1983b). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 15–IN13.
- Bishop, C.D., and Cooper, R.M.** (1984). Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens II. Invasion of resistant cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 277–289.
- Bittel, P., and Robatzek, S.** (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 335–341.
- Bluhm, B.H., Zhao, X., Flaherty, J.E., Xu, J.-R., and Dunkle, L.D.** (2007). RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**, 627–636.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Brandão, R.L., Castro, I.M., Passos, J.B., Nicoli, J.R., and Thevelein, J.M.** (1992). Glucose-induced activation of the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol.* **138 Pt 8**, 1579–1586.

- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G.** (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9452–9457.
- Burnett, J.H.** (1984). Aspects of *Fusarium* genetics. The applied mycology of *Fusarium*. *Held Queen Mary Collage Lond.* 39–69.
- Buruchara, R.A., and Camacho, L.** (2000). Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. *J. Phytopathol.* **148**, 39–45.
- Bustin, S.A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–193.
- Cañero, D.C., and Roncero, M.I.G.** (2008a). Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **98**, 509–518.
- Cañero, D.C., and Roncero, M.I.G.** (2008b). Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* **154**, 1474–1481.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira, F.I., and Di Pietro, A.** (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **48**, 765–779.
- Caracuel, Z., Martínez-Rocha, A.L., Di Pietro, A., Madrid, M.P., and Roncero, M.I.G.** (2005). *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative β -1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **18**, 1140–1147.
- Catinot, J., Huang, J.-B., Huang, P.-Y., Tseng, M.-Y., Chen, Y.-L., Gu, S.-Y., Lo, W.-S., Wang, L.-C., Chen, Y.-R., and Zimmerli, L.** (2015). Ethylene response factor 96 positively regulates *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate- and ethylene-responsive defence genes. *Plant Cell Environ.* **38**, 2721–2734.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., and Lin, T.-P.** (2013). The *Arabidopsis* ethylene response factor 1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different *cis*-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol.* **162**, 1566–1582.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803–814.

- Compant, S., Clément, C., and Sessitsch, A.** (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 669–678.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., and Picard, M.** (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 411–428.
- Correll, J.C., Klittich, C.J.R., and Leslie, J.F.** (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**, 1640–1646.
- Croll, D., and McDonald, B.A.** (2012). The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLOS Pathog.* **8**, e1002608.
- Cross, H., Brick, M.A., Schwartz, H.F., Panella, L., and Byrne, P.F.** (2000). Inheritance of resistance to Fusarium wilt in two common bean races. *Crop Sci.* **40**, 954–958.
- Cuming, A.C.** (2009). Plant–pathogen interactions: a view from the evolutionary basement. *New Phytol.* **183**, 237–239.
- Czymmek, K.J., Fogg, M., Powell, D.H., Sweigard, J., Park, S.-Y., and Kang, S.** (2007). *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 1011–1023.
- Daboussi, M.-J., and Capy, P.** (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 275–299.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Davidzon, M., Alkan, N., Kobilier, I., and Prusky, D.** (2010). Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*. *Postharvest Biol. Technol.* **55**, 71–77.
- Dean, R., Van Kan, J. a. L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 414–430.
- de Jonge, R., Peter van Esse, H., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V., et al.** (2012). Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5110–5115.

- de Sain, M., and Rep, M.** (2015). The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 23970–23993.
- de Vega-Bartol, J.J.** (2009). Expresión de los genes *ftf1* y *ftf2* del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. Universidad de Salamanca.
- de Vega-Bartol, J.J., Martín-Dominguez, R., Ramos, B., García-Sánchez, M.-A., and Díaz-Mínguez, J.M.** (2011). New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* **101**, 470–479.
- de Vega-Bartol, J.J. de, Tello, V., Niño-Sánchez, J., Casado-del Castillo, V. and Díaz-Mínguez, J.M.** (2013). Quantitative PCR analysis of double-stranded RNA-mediated gene silencing in fungi. In Laboratory protocols in fungal biology. (Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., and O'Donovan, A., eds). New York, NY: Springer New York, pp. 279–287.
- Desjardins, A.E.** (2003). *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 177–198.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M., and McCormick, S.P.** (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev.* **57**, (3) 595-604.
- Di, X., Takken, F.L.W., and Tintor, N.** (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Plant Biot. Interact.* **7**, 170.
- Di Pietro, A., and Roncero, M.I.** (1996). Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 295–299.
- Di Pietro, A., García-MacEira, F.I., Méglecz, E., and Roncero, M.I.** (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 1140–1152.
- Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., and Roncero, M.I.G.** (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 315–325.
- Díaz-Mínguez, J.M., Alves-Santos, F.M., Benito, E.P., and Eslava, A.P.** (1996). Fusarium wilt of common bean in the Castilla y León region of Spain. *Plant Dis.* **80**, 600.

- Diéguez-Uribeondo, J., Förster, H., and Adaskaveg, J.E.** (2008). Visualization of localized pathogen-induced pH modulation in almond tissues infected by *Colletotrichum acutatum* using confocal scanning laser microscopy. *Phytopathology* **98**, 1171–1178.
- Diener, A.C., and Ausubel, F.M.** (2005). Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* **171**, 305–321.
- Divon, H.H., and Fluhr, R.** (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 65–74.
- Divon, H.H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., and Fluhr, R.** (2006). The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* **7**, 485–497.
- Dj, R.** (2008). The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem. J.* **409**, 333–348.
- Dóczi, I., Gyetvai, T., Kredics, L., and Nagy, E.** (2004). Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 773–776.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 539–548.
- Doehlemann, G., Requena, N., Schaefer, P., Brunner, F., O’Connell, R., and Parker, J.E.** (2014). Reprogramming of plant cells by filamentous plant-colonizing microbes. *New Phytol.* **204**, 803–814.
- Dotor Robayo, M.Y., and Cabezas Gutiérrez, M.** (2014). Mechanisms of systemic resistance in plants. *Acta Iguazu* **3**, 1–19.
- Dou, D., and Zhou, J.-M.** (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* **12**, 484–495.
- Dufresne, M., Lee, T. van der, M’Barek, S.B., Xu, X., Zhang, X., Liu, T., Waalwijk, C., Zhang, W., Kema, G.H.J., and Daboussi, M.-J.** (2008). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1552–1561.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185–209.

- Duyvesteijn, R.G.E., Van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A.** (2005). Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Mol. Microbiol.* **57**, 1051–1063.
- Edgar, C.I., McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Maclean, D.C., Schenk, P.M., and Kazan, K.** (2006). Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Australas. Plant Pathol.* **35**, 581–591.
- Eshel, D., Lichter, A., Dinooor, A., and Prusky, D.** (2002a). Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 347–358.
- Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., and Prusky, D.** (2002b). pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **15**, 774–779.
- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and Lorenzo, G.D.** (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J.** (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186–194.
- Flood, J.** (2010). The importance of plant health to food security. *Food Secur.* **2**, 215–231.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275–296.
- Frandsen, R.J., Andersson, J.A., Kristensen, M.B., and Giese, H.** (2008). Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Mol. Biol.* **9**, 70.
- Galletti, R., De Lorenzo, G., and Ferrari, S.** (2009). Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* **4**, 33–34.
- García-Sánchez, A., Martín-Rodríguez, N., Ramos, B., de Vega-Bartol, J.J., Perlin, M.H., and Díaz-Mínguez, J.M.** (2010). fost12, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor Ste12, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 216–225.

- Gawehns, F., Houterman, P.M., Ichou, F.A., Michielse, C.B., Hijdra, M., Cornelissen, B.J.C., Rep, M., and Takken, F.L.W.** (2013). The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **27**, 336–348.
- Geiser, D.M., Jiménez-Gasco, M. del M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., and O'donnell, K.** (2004). *Fusarium*-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 473–479.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K.S., and Ganapathi, T.R.** (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnol. J.* **12**, 541–553.
- Glass, N.L., Metzenberg, R.L., and Raju, N.B.** (1990). Homothallic *Sordariaceae* from nature: the absence of strains containing only the mating type sequence. *Exp. Mycol.* **14**, 274–289.
- Glass, N.L., Jacobson, D.J., and Shiu, P.K.T.** (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 165–186.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–227.
- Godoy, P., Cano, J., Gené, J., Guarro, J., Höfling-Lima, A.L., and Lopes Colombo, A.** (2004). Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4494–4497.
- Gordon, T.R., and Martyn, R.D.** (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 111–128.
- Goswami, R.S., and Kistler, H.C.** (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 515–525.
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., Feng, Y., Wang, G., Peng, C., Jiang, X., et al.** (2014). Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* causing banana vascular wilt disease. *PLOS ONE* **9**, e95543.
- Hadas, Y., Goldberg, I., Pines, O., and Prusky, D.** (2007). Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. *Phytopathology* **97**, 384–390.

- Hagedorn, D.J.** (1991). Compendium of bean diseases. *Robert Hall. APS press.*
- Hammerschmidt, R.** (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 77–84.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R.** (1995). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning 3: A Practical Approach. IRL Press Ltd.*, pp. 1–36.
- Harter, L.L.** (1929). A *Fusarium* disease of beans. *Phytopathology* **19**, 84.
- He, C., Hsiang, T., and Wolyn, D.J.** (2001). Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 473–483.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R.** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **10**, 413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **11**, 1026–1030.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W., and Deising, H.B.** (2011). When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J. Plant Physiol.* **168**, 51–62.
- Hornok, L., Waalwijk, C., and Leslie, J.F.** (2007). Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 54–58.
- Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., De Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M.** (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 215–221.
- Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M.** (2008). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLOS Pathog* **4**, e1000061.
- Houterman, P.M., Ma, L., Van Ooijen, G., De Vroomen, M.J., Cornelissen, B.J.C., Takken, F.L.W., and Rep, M.** (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* **58**, 970–978.
- Huang, P.-Y., Catinot, J., and Zimmerli, L.** (2015). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *J. Exp. Bot.* **erv518**.

- Imazaki, I., Kurahashi, M., Iida, Y., and Tsuge, T.** (2007). Fow2, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **63**, 737–753.
- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T., and Takata, R.** (2002). Targeted disruption of a G protein α subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **41**, 407–413.
- Jain, S., Akiyama, K., Kan, T., Ohguchi, T., and Takata, R.** (2003). The G protein β subunit FGB1 regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **43**, 79–86.
- Jain, S., Akiyama, K., Takata, R., and Ohguchi, T.** (2005). Signaling via the G protein α subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 165–172.
- Jiménez-Fernández, D., Landa, B.B., Kang, S., Jiménez-Díaz, R.M., and Navas-Cortés, J.A.** (2013). Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. *PLOS ONE* **8**, e61360.
- Johansson, A., Staal, J., and Dixelius, C.** (2006). Early responses in the *Arabidopsis*-*Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**, 958–969.
- Johnson, K.L., and Ingram, G.C.** (2005). Sending the right signals: regulating receptor kinase activity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 648–656.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jonkers, W., Rodrigues, C.D.A., and Rep, M.** (2009). Impaired colonization and infection of tomato roots by the Δ *frp1* mutant of *Fusarium oxysporum* correlates with reduced CWDE gene expression. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **22**, 507–518.
- Jonkers, W., Xayamongkhon, H., Haas, M., Olivain, C., van der Does, H.C., Broz, K., Rep, M., Alabouvette, C., Steinberg, C., and Kistler, H.C.** (2014). *EBR1* genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environ. Microbiol.* **16**, 1982–2003.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., and Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, J.W. Kronstad, ed. *Springer Netherlands*, pp. 347–371.

- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11086–11091.
- Kawabe, M., Kobayashi, Y., Okada, G., Yamaguchi, I., Teraoka, T., and Arie, T.** (2005). Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of *IGS*, *MAT1*, and *pg1*, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *J. Gen. Plant Pathol.* **71**, 263–272.
- Kb, A., and Mg, P.** (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84–101.
- Kendrick, J.B., and Snyder, W.C.** (1942). Fusarium yellows of beans. *Phytopathology* **32**, 1010–1014.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., and Hornok, L.** (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4419–4423.
- Keszthelyi, A., Jeney, A., Kerényi, Z., Mendes, O., Waalwijk, C., and Hornok, L.** (2006). Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**, 373–391.
- Kim, S., Ahn, I.-P., Rho, H.-S., and Lee, Y.-H.** (2005). *MHP1*, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol. Microbiol.* **57**, 1224–1237.
- Kistler, H.C.** (2001). Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *St. Paul: APS Press*, pp. 70–82.
- Kistler, H.C., and Benny, U.K.** (1988). Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **13**, 145–149.
- Kistler, H.C., Benny, U., Boehm, E.W., and Katan, T.** (1995). Genetic duplication in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **28**, 173–176.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.-M., Yvin, J.-C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B.** (2000). Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **124**, 1027–1038.
- Koeck, M., Hardham, A.R., and Dodds, P.N.** (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell. Microbiol.* **13**, 1849–1857.

- Kraft, J.M., and Haglund, W.A.** (1978). A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*. *Phytopathology* **68**, 273–276.
- Kuč, J.** (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience* **32**, 854–860.
- Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E.M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J., and Bloemberg, G.V.** (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **15**, 172–179.
- Lairini, K., Perez-Espinosa, A., Pineda, M., and Ruiz-Rubio, M.** (1996). Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1604–1609.
- Lazo, G.R., Stein, P.A., and Ludwig, R.A.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **9**, 963–967.
- Leach, J., and Yoder, O.C.** (1983). Heterokaryon incompatibility in the plant-pathogenic fungus, *Cochliobolus heterostrophus*. *J. Hered.* **74**, 149–152.
- Leslie, J.F.** (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 127–150.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., and Summerell, B.A.** (2001). Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**, 107–117.
- Leslie and Summerell** (2006). The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing*.
- Lewis, D.H.** (1973). Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.* **48**, 261–277.
- Li, W., and Mitchell, A.P.** (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**, 63–73.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Lévesque, C.A., Cammue, B.P.A., and Thomma, B.P.H.J.** (2003). Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 113–122.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K.** (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**, 357–362.

- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2003). Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165–178.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V., and Simons, M.** (1999). Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**, 439–446.
- Luttrell, E.S.** (1974). Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* **66**, 1–15.
- Ma, L., Cornelissen, B.J.C., and Takken, F.L.W.** (2013). A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Ma, L., Houterman, P.M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., Clavijo-Ortiz, M.J., Schmidt, S.M., Boeren, S., Vervoort, J., et al.** (2015). The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytol.* **208**, 507–518.
- Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., et al.** (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**, 367–373.
- Macho, A.P., and Zipfel, C.** (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**, 263–272.
- MacPherson, S., Laroche, M., and Turcotte, B.** (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 583–604.
- Madrid, M.P., Di Pietro, A., and Roncero, M.I.G.** (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* **47**, 257–266.
- Makandar, R., Essig, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N., and Shah, J.** (2006). Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**, 123–129.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., and Dietrich, R.A.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**, 403–410.

- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L.** (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**, 359–366.
- Martínez-Rocha, A.L., Roncero, M.I.G., López-Ramírez, A., Mariné, M., Guarro, J., Martínez-Cadena, G., and Di Pietro, A.** (2008). Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell. Microbiol.* **10**, 1339–1351.
- Martín-Urdíroz, M., Madrid, M.P., and Roncero, M.I.G.** (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* **150**, 3175–3187.
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M.I.G., González-Reyes, J.A., and Ruiz-Roldán, C.** (2008). ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* **7**, 112–121.
- Masachis, S., Segorbe, D., Turrà, D., Leon-Ruiz, M., Fürst, U., Ghalid, M.E., Leonard, G., López-Berges, M.S., Richards, T.A., Felix, G., et al.** (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. *Nat. Microbiol.* **1**, 16043.
- Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A.J.** (1994). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **7**, 378–383.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.-R., Udvardi, M.K., and Kazan, K.** (2005). Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* **139**, 949–959.
- Mendgen, K., and Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* **7**, 352–356.
- Ment, D., Alkan, N., Luria, N., Bi, F.-C., Reuveni, E., Fluhr, R., and Prusky, D.** (2015). A role of AREB in the regulation of PACC-dependent acid-expressed-genes and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **28**, 154–166.
- Michaelis, T.E.** (1991). Compendium of bean diseases. *APS Press*.
- Michielse, C.B., and Rep, M.** (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 311–324.

- Michielse, C.B., Wijk, R. van, Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C., and Rep, M.** (2009a). The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog* **5**, e1000637.
- Michielse, C.B., Wijk, R. van, Reijnen, L., Cornelissen, B.J., and Rep, M.** (2009b). Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol.* **10**, 1–18.
- Mingot, J.-M., Tilburn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, M., Widdick, D.A., Sarkar, S., Brown, C.V., Caddick, M.X., Espeso, E.A., et al.** (1999). Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1390–1400.
- Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C., and González-Jaén, M.T.** (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 213–221.
- Mishra, P.K., Fox, R.T.V., and Culham, A.** (2002). Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intraspecific variation within populations of *Fusarium culmorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 291–296.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19613–19618.
- Miyara, I., Shafran, H., Davidzon, M., Sherman, A., and Prusky, D.** (2010). pH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **23**, 304–316.
- Miyara, I., Shnaiderman, C., Meng, X., Vargas, W.A., Diaz-Minguez, J.M., Sherman, A., Thon, M., and Prusky, D.** (2012). Role of nitrogen-metabolism genes expressed during pathogenicity of the alkalinizing *Colletotrichum gloeosporioides* and their differential expression in acidifying pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 1251–1263.
- Moffat, C.S., Ingle, R.A., Wathugala, D.L., Saunders, N.J., Knight, H., and Knight, M.R.** (2012). ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* **7**, e35995.

- Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M., and Kang, S.** (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**, 173–180.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4321–4325.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006a). Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **140**, 411–432.
- Nakano, T., Suzuki, K., Ohtsuki, N., Tsujimoto, Y., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006b). Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **119**, 407–413.
- Nelson, M.A.** (1996). Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet.* **12**, 69–74.
- Nelson, P.E.** (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In vascular wilt, host plants, soils, nematode interactions. *Academic Press*.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O.** (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. *Pennsylvania State University Press*.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J.** (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 479–504.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G.** (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Niño-Sánchez, J.** (2016). La familia génica *FTF* determina el patrón de colonización y la virulencia en *Fusarium oxysporum*. Universidad de Salamanca.
- Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M.R., Benito, E.P., and Díaz-Mínguez, J.M.** (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* **6**.
- Niño-Sánchez, J., Casado-Del Castillo, V., Tello, V., de Vega-Bartol, J.J., Ramos, B., Sukno, S.A., and Díaz Mínguez, J.M.** (2016). The *FTF* gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1124–1139.
- Nucci, M., and Anaissie, E.** (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 695–704.

- Nürnberg, T., and Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 318–324.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249–266.
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., et al.** (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* **44**, 1060–1065.
- O’Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H.I.** (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**, 465–493.
- O’Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P.R., Crous, P.W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N.C., Colyer, P., Waalwijk, C., et al.** (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 936–948.
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **144**, 31–43.
- Ohara, T., Inoue, I., Namiki, F., Kunoh, H., and Tsuge, T.** (2004). REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamyospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* **166**, 113–124.
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L’Haridon, F., and Alabouvette, C.** (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1523–1531.
- Oñate-Sánchez, L., Anderson, J.P., Young, J., and Singh, K.B.** (2006). AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol.* **143**, 400–409.
- Orejas, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H.N., and Peñalva, M.A.** (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622–1632.

- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Mayayo, E., and Pietro, A.D.** (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* **72**, 1760–1766.
- Ospina-Giraldo, M.D., Mullins, E., and Kang, S.** (2003). Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Curr. Genet.* **44**, 49–57.
- Parbery, D.G.** (1996). Trophism and the ecology of fungi associated with plants. *Biol. Rev.* **71**, 473–527.
- Pardo, E., and Orejas, M.** (2014). The *Aspergillus nidulans* Zn(II)₂Cys₆ transcription factor AN5673/RhaR mediates L-rhamnose utilization and the production of α-L-rhamnosidases. *Microb. Cell Factories* **13**.
- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M.I.G., and Ruiz-Roldán, M.C.** (2008). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**, 728–736.
- Pastor-Corrales, M.A., and Abawi, G.S.** (1987). Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Dis.* **71**, 990.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N.** (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426–446.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M., and Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant *defensin* gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309–2323.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O’Connell, R.J., and Green, J.R.** (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* **27**, 186–198.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pieterse, C.M., Ton, J., and Van Loon, L.C.** (2001). Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* **3**, 1–8.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308–316.

- Pieterse, C.M.J., Does, D.V. der, Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Wees, S.C.M.V.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489–521.
- Ploetz, R.C., and Correll, J.C.** (1988). Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Dis.* **72**, 325–328.
- Poppe, S., Dorsheimer, L., Happel, P., and Stukenbrock, E.H.** (2015). Rapidly evolving genes are key players in host specialization and virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*). *PLOS Pathog* **11**, e1005055.
- Postel, S., and Kemmerling, B.** (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 1025–1031.
- Prusky, D., and Yakoby, N.** (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol. Plant Pathol.* **4**, 509–516.
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B., and Conway, W.S.** (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **14**, 1105–1113.
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Saftner, R., Conway, W.S., and Jones, R.** (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* **94**, 44–51.
- Prusky, D.B., Bi, F., Moral, J., and Barad, S.** (2016). How does host carbon concentration modulate the lifestyle of postharvest pathogens during colonization? *Front. Plant Sci.* **7**.
- Puhalla, J.E.** (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**, 179–183.
- Ramos, B.** (2005). Análisis de factores de patogenicidad y virulencia en el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Universidad de Salamanca.
- Ramos, B., Alves-Santos, F.M., García-Sánchez, M.A., Martín-Rodríguez, N., Eslava, A.P., and Díaz-Mínguez, J.M.** (2007). The gene coding for a new transcription factor (*ftf1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 864–876.

- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., and Cornelissen, B.J.C.** (2002). Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* **130**, 904–917.
- Rep, M., Van Der Does, H.C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., De Koster, C.G., and Cornelissen, B.J.C.** (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* **53**, 1373–1383.
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P.M., Does, H.C. van der, and Cornelissen, B.J.C.** (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **18**, 15–23.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 707–719.
- Ribeiro, R., and Hagedorn, D.J.** (1979). Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* **69**, 859–861.
- Roddick, J.G.** (1977). Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **16**, 805–807.
- Rollins, J.A., and Dickman, M.B.** (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 75–81.
- Ron, M., and Avni, A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**, 1604–1615.
- Roncero, M.I., Di Pietro, A., Ruiz-Roldan, M.C., Huertas-González, M.D., García-Maceira, F., Méglecz, E., Jiménez, A., Caracuel, Z., Sancho-Zapatero, R., Hera, C., et al.** (2000). Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**, S47-53.
- Ross, A.F.** (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340–358.

- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tör, M., Vries, S. de, and Zipfel, C. (2011). The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**, 2440–2455.
- Ruijter, G.J.G., van de Vondervoort, P.J.I., and Visser, J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* **145**, 2569–2576.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Salgado, M.O., and Schwartz, H.F. (1993). Physiological specialization and effects of inoculum concentration of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on common beans. *Plant Dis.* **77**, 492–496.
- Salgado, M.O., Schwartz, H.F., Brick, M.A., and Corrales, M.A.P. (1994). Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in tepary beans (*Phaseolus acutifolius*). *Plant Dis.* **78**, (4) 357-360.
- Salgado, M.O., Schwartz, H.F., and Brick, M.A. (1995). Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Dis.* **79**, 279–281.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.-H., Clément, C., Baillieul, F., and Dorey, S. (2012). Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid^{1[C][W][OA]}. *Plant Physiol.* **160**, 1630–1641.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467.
- Sarrocco, S., Falaschi, N., Vergara, M., Nicoletti, F., and Vannacci, G. (2007). Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *J. Plant Pathol.* **89**, 47–54.

- Savchenko, T., Walley, J.W., Chehab, E.W., Xiao, Y., Kaspi, R., Pye, M.F., Mohamed, M.E., Lazarus, C.M., Bostock, R.M., and Dehesh, K. (2010). Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks^{[C][W]}. *Plant Cell* **22**, 3193–3205.
- Scheler, C., Durner, J., and Astier, J. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 534–539.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11655–11660.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Rusu, A.G., Manners, J.M., and Maclean, D.J. (2005). The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 997–1005.
- Schjerling, P., and Holmberg, S. (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4599–4607.
- Schmidt, S.M., Houterman, P.M., Schreiver, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., Boeren, S., Takken, F.L.W., and Rep, M. (2013). MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* **14**, 119.
- Seifert, K.A., and Levesque, C.A. (2004). In phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. In molecular diversity and PCR-detection of toxigenic *Fusarium* species and ochratoxigenic fungi. *Springer*, pp. 449–471.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., and Métraux, J.-P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Snyder, W.C., and Hansen, H.N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* **27**, 64–67.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N., and Oswald, J.W. (1957). Cultivars of the fungus *Fusarium*. *J Madras Univ.* **27**, 185–192.
- Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., Park, A.R., Lee, J., Jin, J.-M., Lin, Y., Cao, P., Hong, S.-Y., Kim, E.-K., *et al.* (2011). A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*. *PLOS Pathog* **7**, e1002310.

- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- Spoel, S.H., and Dong, X.** (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 89–100.
- Steiner, S., Wendland, J., Wright, M.C., and Philippsen, P.** (1995). Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* **140**, 973–987.
- Strable, J., and Scanlon, M.J.** (2009). Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, pdb.emo132.
- Suárez, T., and Peñalva, M.A.** (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB–pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* **20**, 529–540.
- Summerell, B.A., Salleh, B., and Leslie, J.F.** (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* **87**, 117–128.
- Talbot, N.J., Ebbole, D.J., and Hamer, J.E.** (1993). Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575–1590.
- Talbot, N.J., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., De Vries, O., Wessels, J., and Hamer, J.E.** (1996). *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985–999.
- Teunissen, H., Verkooijen, J., Cornelissen, B., and Haring, M.** (2002). Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Genet. Genomics* **268**, 298–310.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 63–68.
- Thynne, E., Saur, I.M.L., Simbaqueba, J., Ogilvie, H.A., Gonzalez-Cendales, Y., Mead, O., Taranto, A., Catanzariti, A.-M., McDonald, M.C., Schwessinger, B., et al.** (2016). Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Mol. Plant Pathol.* DOI: 10.1111/mpp. 12444.

- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779–790.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**, 373–378.
- Tu, J.C. (1985). Improved Mathur's medium for growth, sporulation, and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios.* **44**, 87-93.
- Turrà, D., El Ghalid, M., Rossi, F., and Di Pietro, A. (2015). Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature* **527**, 521–524.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 645–656.
- van der Does, H.C., Duyvesteijn, R.G.E., Goltstein, P.M., van Schie, C.C.N., Manders, E.M.M., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M. (2008). Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1257–1264.
- van der Does, H.C., Fokkens, L., Yang, A., Schmidt, S.M., Langereis, L., Lukasiewicz, J.M., Hughes, T.R., and Rep, M. (2016). Transcription factors encoded on core and accessory chromosomes of *Fusarium oxysporum* induce expression of effector genes. *PLOS Genet.* **12**, e1006401.
- Vázquez-de-Aldana, B.R., Zabalgoceazcoa, I., García-Ciudad, A., and García-Criado, B. (2013). An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant Soil* **362**, 201–213.
- Vázquez-de-Aldana, B.R., Soto-Barajas, M.-C., and Zabalgoceazcoa, I. (2015). *Epichloë* endophytes in pastures of the Iberian peninsula. *Pastos* **45**, 6–18.
- Veloso, J., Alabouvette, C., Olivain, C., Flors, V., Pastor, V., García, T., and Díaz, J. (2016). Modes of action of the protective strain Fo47 in controlling *Verticillium* wilt of pepper. *Plant Pathol.* **65**, 997–1007.
- Verburg, J.G., and Huynh, Q.K. (1991). Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **95**, 450–455.

- Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Schmidt, S.M., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M.** (2016). Dispensable chromosomes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1455–1466.
- Voigt, K., Schleier, S., and Brückner, B.** (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* **27**, 528–535.
- Vu, T., Hauschild, R., and Sikora, R.A.** (2006). *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology* **8**, 847–852.
- Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghai-Marooof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P., and Allard, R.W.** (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2097–2100.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63.
- Woo, S.L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F., and Noviello, C.** (1996). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* **86**, 966–973.
- Wu, H.-S., Liu, D.-Y., Ning-Ling, Bao, W., Ying, R.-R., Ou, Y.-H., Huo, Z.-H., Li, Y.-F., et al.** (2008a). Effects of vanillic acid on the growth and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Allelopathy J.* **22**, 111–121.
- Wu, H.-S., Raza, W., Fan, J.-Q., Sun, Y.-G., Bao, W., and Shen, Q.-R.** (2008b). Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by *in vitro* cultures of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1316–1321.
- Wu, H.-S., Raza, W., Liu, D.-Y., Wu, C.-L., Mao, Z.-S., Xu, Y.-C., and Shen, Q.-R.** (2008c). Allelopathic impact of artificially applied coumarin on *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1297–1304.
- Yakoby, N., Freeman, S., Dinoor, A., Keen, N.T., and Prusky, D.** (2000). Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**, 887–891.
- Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, N.T., Dinoor, A., Pines, O., and Prusky, D.** (2001). *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **14**, 988–995.

- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., and Wu, K.** (2005). *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol. Biol.* **58**, 585–596.
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I.** (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1061–1070.
- Yun, S.-H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G.** (2000). Molecular organization of mating type *loci* in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* **31**, 7–20.
- Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.-M., and Nayak, S.C.** (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 182–207.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., et al.** (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**, 290–301.
- Zhao, C., Waalwijk, C., de Wit, P.J.G.M., van der Lee, T., and Tang, D.** (2011). EBR1, a novel Zn₂Cys₆ transcription factor, affects virulence and apical dominance of the hyphal tip in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**, 1407–1418.

