

La familia génica *FTF* determina el patrón de colonización y la virulencia en *Fusarium oxysporum*

-Jonatan Niño Sánchez-



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Área de Genética
Dpto. de Microbiología y Genética
Facultad de Biología

AGRICULTURA
cialle
CENTRO HISPANOLUSO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
ÁREA: GENÉTICA

**La familia génica *FTF* determina el
patrón de colonización y la virulencia
en *Fusarium oxysporum***

-Jonatan Niño Sánchez-

Dirigido por:

Dr. José María Díaz Mínguez

Salamanca, 2016

Esta tesis corresponde a un compendio de dos trabajos previamente publicados y a un trabajo aceptado para su publicación.

Primera publicación: Publicada en [Frontiers in Microbiology](#).

DOI: 10.3389/fmicb.2015.00234

Título completo: Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*.

Referencia:

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*. *Name Front. Microbiol.* 6, 234.

Segunda publicación: Aceptada en [Molecular Plant Pathology](#).

DOI: 10.1111/mpp.12373

Título completo: The *FTF* gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in *Fusarium oxysporum*.

Referencia:

Niño-Sánchez, J., Casado-del Castillo, V., Tello, V., Vega-Bartol, J.J. de, 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.*

Tercera publicación: Capítulo de libro publicado por [Springer](#).

DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0

Título completo: Quantitative PCR analysis of double-stranded RNA-mediated gene silencing in fungi. Capítulo 22 de Laboratory protocols in fungal biology.

Referencia:

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), pp. 279–287. New York, NY: Springer New York.

Afiliación de los autores:

Jonatan Niño Sánchez, Virginia Casado del Castillo, Vega Tello Hernández, Ernesto Pérez Benito, Serenella Ana Sukno, Michael Ronald Thon, José María Díaz Mínguez: Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

M^a Brisa Ramos Martínez: Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid - INIA.

José Javier de Vega Bartol: The Genome Analysis Centre (TGAC). Norwich Research Park.

Carta de aceptación de la Segunda publicación en Molecular Plant Pathology.

De: mbdickman@tamu.edu

Asunto: Decision on manuscript MPP-OA-15-343.R1

Fecha: 18 de enero de 2016, 17:23:35 CET

Para: josediaz@usal.es

18-Jan-2016

Dear Prof. Díaz-Mínguez

I am happy to accept your manuscript entitled "The FTF gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in Fusarium oxysporum" in its current form for publication in Molecular Plant Pathology.

The reviewer(s)' comments are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution.

You and your colleagues can enjoy online access to your paper once published by registering for Author Services. This free service also allows you to track the progress of your paper through the rest of the publication process.

Visit www.authorservices.wiley.com/bauthor <<http://www.authorservices.wiley.com/bauthor>> to join.

Sincerely,

Marty Dickman

Senior Editor, Molecular Plant Pathology
mbdickman@tamu.edu

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

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“La familia génica *FTF* determina el patrón de colonización y la virulencia en *Fusarium oxysporum*”**, en formato de compendio de trabajos previamente publicados o aceptados para publicación, 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 **D. Jonatan Niño Sánchez**, 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 16 de marzo de 2016

Fdo: Dr. D. Luis Román Fernández Lago

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

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“La familia génica *FTF* determina el patrón de colonización y la virulencia en *Fusarium oxysporum*”**, en formato de compendio de trabajos previamente publicados o aceptados para publicación 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, bajo mi dirección, por **D. Jonatan Niño Sánchez**, 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 16 de marzo de 2016

Fdo: Dr. D. José María Díaz Mínguez

Fdo: D. Jonatan Niño Sánchez

- Examina, pues -dije-, qué pasaría si fueran liberados de sus cadenas y curados de su ignorancia, y si, conforme a naturaleza, les ocurriera lo siguiente. Cuando uno de ellos fuera desatado y obligado a levantarse súbitamente y a volver el cuello y a andar y a mirar a la luz, y cuando, al hacer todo esto, sintiera dolor y, por causa de las chiribitas, no fuera capaz de ver aquellos objetos cuyas sombras veía antes, ¿qué crees que contestaría si le dijera alguien que antes no veía más que sombras inanes y que es ahora cuando, hallándose más cerca de la realidad y vuelto de cara a objetos más reales, goza de una visión más verdadera?, y si fuera mostrándole los objetos que pasan y obligándole a contestar a sus preguntas acerca de qué es cada uno de ellos, ¿No crees que estaría perplejo y que lo que antes había contemplado le parecería más verdadero que lo que entonces se le mostraba?

- Mucho más -dijo-.

- Y si se le obligara a fijar su vista en la luz misma, ¿no crees que le dolerían los ojos y que se escaparía, volviéndose hacia aquellos objetos que puede contemplar, y que consideraría que éstos, son realmente más claros que los que le muestran?

- Así es -dijo-.

- Y si se lo llevaran de allí a la fuerza -dije-, obligándole a recorrer la áspera y escarpada subida, y no le dejaran antes de haberle arrastrado hasta la luz del sol, ¿no crees que sufriría y llevaría a mal el ser arrastrado, y que, una vez llegado a la luz, tendría los ojos tan llenos de ella que no sería capaz de ver ni una sola de las cosas a las que ahora llamamos verdaderas?

- No, no sería capaz -dijo-, al menos por el momento.

- Necesitaría acostumbrarse, creo yo, para poder llegar a ver las cosas de arriba. Lo que vería más fácilmente serían, ante todo, las sombras; luego, las imágenes de hombres y de otros objetos reflejados en las aguas, y más tarde, los objetos mismos. Y después de esto le sería más fácil el contemplar de noche las cosas del cielo y el cielo mismo, fijando su vista en la luz de las estrellas y la luna, que el ver de día el sol y lo que le es propio.

A mis padres



Ilustración de la portada por Rebeca Graell Sánchez



-Índices-

Índice general

Índices	I
Índice general	III
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
Introducción	1
Género <i>Fusarium</i>	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	7
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	18
Respuesta defensiva de la planta frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	21
Objetivos	29
Primera publicación	33
<u>Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) by highly virulent and weakly virulent strains of <i>Fusarium oxysporum</i></u>	
Resumen en castellano	49
Segunda publicación	57
<u>The <i>FTF</i> gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in <i>Fusarium oxysporum</i></u>	
Resumen en castellano	85
Tercera publicación	93
<u>Quantitative PCR analysis of double-stranded RNA-mediated gene silencing in fungi</u>	
Resumen en castellano	105
Discusión general	111
Papel de <i>FTF1</i> en la colonización del huésped	114
Papel de <i>FTF1</i> en la regulación de genes efectores	115
Origen de <i>FTF1</i>	117
Cuestiones relevantes por dilucidar	121
Conclusiones	125
Apéndice I. Materiales y métodos	129
Apéndice II	165
Referencias	169

Índice de figuras

Figura 1. [pág.3](#). Conidiación de la estirpe silvestre Mel02010 perteneciente a *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.

Figura 2. [pág.9](#). Ciclo de infección de *F. oxysporum*.

Figura 3. [pág.13](#). Resumen esquemático de las interacciones entre las proteínas AVR de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y las proteínas de resistencia de la planta *Solanum lycopersicum*.

Figura 4. [pág.19](#). Comparación sintomática de plantas sanas de *P. vulgaris* frente a plantas infectadas por un aislado muy virulento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Figura 5. [pág.24](#). Producción y función de las especies reactivas de oxígeno en respuesta a patógenos.

Figura 6. [pág.26](#). Red de señales de transducción implicadas en la respuesta defensiva de *Arabidopsis thaliana* frente a *Fusarium oxysporum*.

Figura 7. [pág.116](#). Hipotética cascada de señalización reguladora de los genes efectores *SIX1* y *SIX6* en *F. oxysporum*.

Figura 8. [pág.118](#). Relación filogenética discordante de proteínas codificadas en las regiones *LS*.

Figura 9. [pág.120](#). Detalle de las regiones subcromosómicas *LS* 2.36 y 2.51 enriquecidas en elementos transponibles y genes *SIX* flanqueando los *loci* de *FTF1* *FOXG_16414* y *FOXG_17458* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Figura 10. [pág.145](#). Estrategia de clonación USER Friendly para la construcción en un paso de un vector de reemplazamiento génico.

Figura 11. [pág.146](#). Vectores utilizados en la clonación USER Friendly.

Figura 12. [pág.147](#). Vector gGFP.

Figura 13. [pág.148](#). Vector de silenciamiento pJL43-RNAi y diagrama de formación de ARNds.

Índice de tablas

Tabla 1. [pág.17](#). Localización cromosómica de los genes *FOW2*, *EBR* y *FTF* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tabla 2. [pág.18](#). Información de la estructura genómica de las formas especiales de *F. oxysporum* secuenciadas en el proyecto *Broad Institute*.

Tabla 3. [pág.19](#). Estudio de Resistencia/Susceptibilidad de variedades diferenciales de *Phaseolus vulgaris* L. frente a razas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Tabla 4. [pág.131](#). Estirpes de *F. oxysporum* utilizadas en este trabajo.

Tabla 5. [pág.136](#). Escala CIAT.

Tabla 5. [pág.154](#). Compuestos y proporciones en la elaboración de medio mínimo y medio de inducción.

Tabla 6. [pág.167](#). Listado de cebadores utilizados en la construcción de plásmidos y de uso común.

Tabla 7. [pág.168](#). Listado de cebadores utilizados en PCR a tiempo real.

Abreviaturas

A	Adenina
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADNr	ADN ribosómico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	ARN de doble cadena
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citosina
CDP-star	2-Cloro-5-(4-metoxipiro(1,2-dioxietano-3,2'-(5'cloro)triciclo[3.3.1.1.3.7]decan)-4il)-1-fenilfosfato disódico
ChIP-Seq	<i>Chromatin immunoprecipitation sequencing.</i> Inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación en paralelo
cm	Centímetro
cm²	Centímetro cuadrado
Ct	<i>Threshold cycle.</i> Ciclo umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
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'-Desoxiuridina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	<i>Et allí.</i> Y colaboradores
ET	Etileno

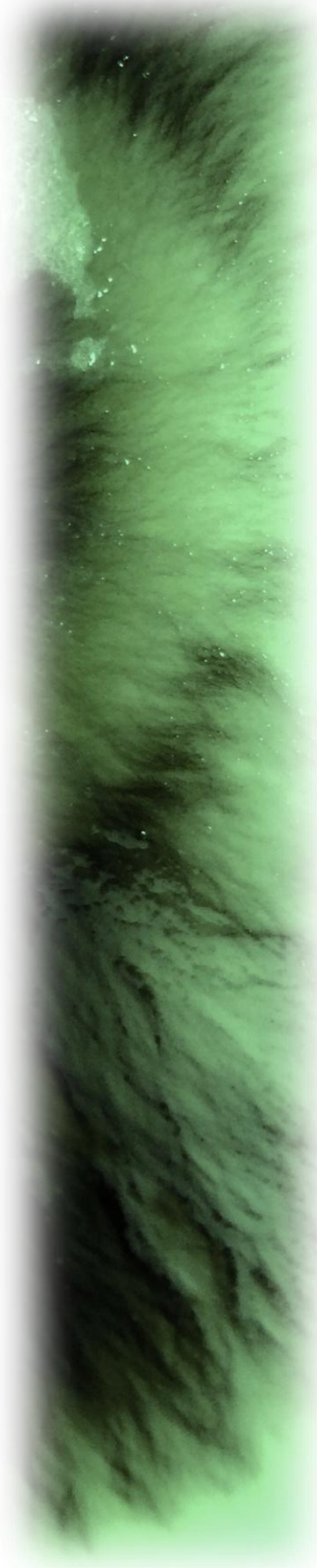
f. sp.	<i>Forma specialis</i> . Forma especial
Fig.	Figura
Fol	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
FOP	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
g	Gramo
G	Guanina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> . Proteína verde fluorescente
h	Hora
IGP	Indicación geográfica protegida
IGS	<i>Intergenic spacer</i> . Región espaciadora intergénica
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JA	Ácido jasmónico
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
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
MI	Medio de inducción
mL	Mililitro
MM	Medio mínimo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico
ms	Milisegundo
N	Normal
nM	Nanomolar

°C	Grado Celsius
ORF	<i>Open reading frame</i> . Marco de lectura abierta
pág.	Página
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	<i>Quantitative PCR</i> . PCR cuantitativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i> . ADN polimórfico amplificado al azar
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> . Especies reactivas de oxígeno
RQ	<i>Relative quantity of transcript</i> . Cantidad relativa de transcrito
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
SSC	Tampón citrato de Sodio cloruro de sodio
T	Timina
TAE	Tris acético EDTA
TFB1	<i>Transformation buffer 1</i> . Tampón de transformación 1
TFB2	<i>Transformation buffer 2</i> . Tampón de transformación 2
Tm	<i>Melting temperatura</i> . Temperatura de fusión
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracilo
V	Voltio
V	Volumen
VCG	<i>Vegetative compability group</i> . Grupo de compatibilidad vegetativa
x g	Aceleración gravitacional
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido
Ω	Ohmio

μF Microfaradio

μg Microgramo

μL Microlitro



-Introducción-

1. Genero *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un extenso y heterogéneo grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos con capacidad, mediante diferentes estrategias infecciosas, de colonizar gran variedad de hospedadores vegetales (Desjardins, 2003; Goswami y Kistler, 2004; Di Pietro *et al.*, 2003). Viven en el suelo de forma saprófita, obteniendo energía a través de compuestos de materia orgánica muerta o detritos desechados por otros seres vivos. Son considerados hongos fitopatógenos puesto que muchos de ellos son capaces de reconocer e infectar su planta hospedadora. Debido a la complejidad del género y al alto rango de especies vegetales susceptibles, el cuadro sintomatológico que presenta la fusariosis en la planta es diverso y general: marchitamiento, podredumbres de raíz, producción de chancros, etc. En algunos casos reciben nombres específicos según los efectos producidos en la planta, como la roya del trigo, tizón de la cebada, la podredumbre del maíz, o el mal de Panamá, que afecta a bananos. Por ello, su control en cultivos de interés agrícola permitiría limitar las enormes pérdidas económicas que producen (Ma *et al.*, 2010).

No sólo origina complicaciones en el reino vegetal, sino que para animales y humanos supone un riesgo indirecto de padecer enfermedades severas causadas por la ingesta de productos contaminados con micotoxinas y productos de metabolismo secundario originados por algunos de los integrantes de este género (Desjardins, 2003). Gran parte de las últimas líneas de investigación en este campo tienen un objetivo clínico, pues *Fusarium* ha sido descrito como patógeno humano en pacientes inmunodeprimidos (Nelson *et al.*, 1994; Ortoneda *et al.*, 2004), causante de enfermedades como la queratitis fúngica y la endoftalmitis (Doczi *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2004).

Taxonomía

El género presenta una clasificación compleja. Actualmente está incluido dentro del grupo de los Ascomicetos, en la división Ascomicota, clase Sordariomycetes, orden Hipocreales, familia Nectriaceae.

Fue definido por primera vez en la moderna terminología de sistema científico por Link (1809) aunque los primeros datos, recogidos por un monje franciscano en México en el siglo XVI, se basaron en las descripciones del pueblo Azteca, que habían observado la podredumbre que en el maíz producía el hongo ahora conocido como *Fusarium vertillioides*.

La correcta categorización dentro del género *Fusarium* ha sido problemática desde su comienzo debido a los diferentes y contrapuestos sistemas de clasificación morfológicos, como los llevados a cabo por 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 las diferentes clasificaciones de Nelson en 1983 (Nelson *et al.*, 1983) y 1990 que acabó distinguiendo 14 especies dentro de este género. Todas estas clasificaciones se basaron fundamentalmente en caracteres morfológicos como la forma, tamaño, septación de las conidias y clamidosporas; así como la evaluación de la tasa de crecimiento miceliar y color del micelio en medios sólidos, valoraciones que son altamente variables dependiendo de las condiciones del medio de crecimiento e incubación del cultivo (Leslie *et al.*, 2001; Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2003).

Debido a los problemas que plantea una clasificación filogenética puramente morfológica, en el último quindenio se han utilizado herramientas moleculares para la identificación y determinación de las relaciones evolutivas en el género. Estas herramientas incluyen la secuenciación intergénica 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 espaciador intergénico ribosomal (entre 28S y 18S), cuya variabilidad entre especies del mismo género es mayor que las regiones ITS, permitiendo en ocasiones una clasificación intraespecífica (Mishra *et al.*, 2002).

No sólo las regiones intergénicas ribosomales han sido utilizadas para la elaboración de la filogenia del género, sino que se han tenido en consideración otras secuencias codificadoras de copia única ricas en intrones como los genes codificantes para la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3, poligalacturonasas (pg1) y los dos genes idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2* (Seifert y Levesque, 2004) (Kawabe *et al.*, 2005). Sin embargo, la más utilizada para la discriminación a nivel de especie en el género

Fusarium es la secuencia nucleotídica del gen *EF-1 α* , que codifica un factor de elongación en la traducción de proteínas (Geiser *et al.*, 2004).

Reproducción

Una característica importante del género *Fusarium* es la variabilidad en cuanto a su capacidad sexual, existiendo especies teleomórficas y especies anamórficas, agámicas o de reproducción sexual desconocida.

Los principales géneros en los que se agrupan las formas teleomórficas de *Fusarium* son *Gibberella* y algunos géneros segregados de *Nectria*. Algunos miembros del género *Fusarium* con reproducción sexual conocida son *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), *Fusarium graminearum* (*Giberella zae*) y, *Fusarium verticilloides* (*Giberella fujikuroi*). En estas especies se produce la fusión de los núcleos de diferentes individuos que da lugar a un núcleo diploide que entra posteriormente en meiosis, logrando de esta manera variabilidad genética. Los genes responsables de los mecanismos que controlan los fenómenos de reproducción sexual son los denominados genes de apareamiento o *mating-type*, que consisten en un *locus* con dos alelos funcionales, de baja similitud en su secuencia, a los que históricamente se ha designado como *MAT-1* y *MAT-2* (Glass *et al.*, 1990; Hornok *et al.*, 2007; Kerenyi *et al.*, 2004; Keszthelyi *et al.*, 2007), y que determinan la habilidad de dos individuos para fusionar sus núcleos (Nelson, 1996). A diferencia de levaduras, no existen copias adicionales de estas secuencias 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 en formas anamórficas como *Fusarium oxysporum*, con ciclo sexual no conocido, lo que sugiere que deben de existir otros mecanismos adicionales que regulan la reproducción sexual (Kerenyi *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2000). En este sentido, un reciente estudio indica que la proteína Ste2, homóloga a un α -receptor de feromonas sexuales de *Saccharomyces cerevisiae*, es necesaria en *F. oxysporum* para el quimiotropismo hacia la planta hospedadora (Turrà *et al.*, 2015).

La generación de variabilidad genética en las formas anamórficas se explica mediante distintos mecanismos: existencia de heterocariosis, o fusión de hifas sin

cariogamia (Burnett, 1984; Correl *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).

Los hongos que son haploides obtienen ciertos beneficios de la diploidía que ocurre en la heterocariosis. Si dos estirpes son 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 o VCG (*vegetative compatibility group*). Si por el contrario, tras la fusión de las hifas se produce una lisis celular, estas estirpes se consideran incompatibles (Glass *et al.*, 2000; Leslie, 1993). Al igual que en otros Ascomicetos, la formación del heterocarionte se debe a determinados *loci* cuyos productos génicos son mediadores en la compatibilidad vegetativa. Se han descrito al menos diez *loci* (*het* o *vic*) implicados (Leslie 1993). Esto indica que la formación de un heterocarionte estable es posible cuando los alelos de estos *loci* son iguales en las dos estirpes (Leach y Yoder, 1983). Los VCG han sido utilizados por numerosos autores para estudiar la variabilidad intraespecífica del género (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Ploetz y Correll, 1988; Puhalla, 1985; Woo *et al.*, 1996).

En los heterocariontes vegetativos no se descarta la existencia de mecanismos de parasexualidad, puesto que se han observado procesos de intercambio genético en estirpes de *F. oxysporum* dando como resultado reorganizaciones cromosómicas (Ma *et al.*, 2010).

Tipos de patógenos

El género *Fusarium* agrupa a importantes fitopatógenos que infectan variedad de cultivos de gran importancia agrícola. Podemos dividir a las especies del género patógenos de plantas en 3 grupos:

- **Patógenos de gramíneas.** Producen el denominado “decaimiento” o “marchitez”. Destacan sobre todo por ser los principales productores de micotoxinas del género y ser capaces de contaminar las semillas de cebada, maíz, trigo, etc.

Ejemplos: *F. sporotrichioides*, *F. verticilloides*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*.

- **Patógenos radiculares.** Son responsables de las pudriciones radiculares. Son causa de daños importantes en cultivos de solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas y plantas ornamentales. También pueden actuar como patógenos oportunistas en plantas con sistema radicular debilitado. Ejemplo: *F. solani*.

- **Patógenos vasculares.** Son causantes de la fusariosis vascular, que afecta a numerosos cultivos de algodón, tabaco, café, leguminosas, cucurbitáceas, plantagináceas e incluso algunas leñosas (palmera) y a cultivos de plantas ornamentales como el clavel, crisantemo o el gladiolo. Ejemplo: *F. oxysporum*.

- **Patógenos postcosecha.** El género *Fusarium* no destaca principalmente por los daños causados en postcosecha, pero muchos de sus miembros pueden actuar de este modo si las condiciones de temperatura y humedad son favorables. Ejemplos: *F. moniliforme*, *F. stilboides*.

2. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr. es un complejo de especies (FOSC) anamórficas que muestran una considerable variabilidad morfológica y fisiológica (O'Donnell *et al.*, 2009). Este hongo es ubicuo en suelos de todo el mundo, pudiendo crecer de manera saprófita o colonizando plantas. Sus variantes patógenas causan la enfermedad conocida como fusariosis vascular, caracterizada en la planta por decaimiento, clorosis y marchitez, síntomas resultantes de la colonización de los haces vasculares. A esta enfermedad son susceptibles más de 100 especies vegetales (Michielse y Rep, 2009), algunas de ellas de repercusión económica como son la banana (*Musa* spp.), el tomate (*Solanum* spp.), la alubia (*Phaseolus* spp.), el algodón (*Gossypium* spp.), el guisante (*Pisum* spp.), etc. Como veremos más adelante, el rango de hospedador es usado para subdividir este complejo de especies en patógenos específicos designados formas especiales o *formae speciales* (f. sp.) (Snyder y Hansen, 1940), habiendo sido descritas hasta la fecha más de 120 (Di *et al.*, 2016).

En cuanto a la morfología, la característica especial de este complejo de especies es la existencia de tres tipos de esporas:

- **Microconidios:** Estructuras unicelulares. Son las más abundantes, y se producen bajo diferentes condiciones (medios sintéticos en cultivo *in vitro*, haces vasculares de una planta infectada).
- **Macroconidios:** Estructuras generalmente alargadas y ligeramente curvadas, compuestas de tres a cinco células sucesivas separadas por septos. Se producen comúnmente en el desarrollo del hongo sobre la planta muerta.
- **Clamidosporas:** Estructuras esféricas, generalmente unicelulares, desarrolladas a través de modificaciones en la zona terminal de la hifa. Su producción está inducida por el envejecimiento del micelio y por condiciones ambientales desfavorables, como son las bajas temperaturas o una fuente de carbono limitada, actuando como formas de resistencia. Su producción se puede observar en los estadios finales de la colonización (Agrios, 1997).

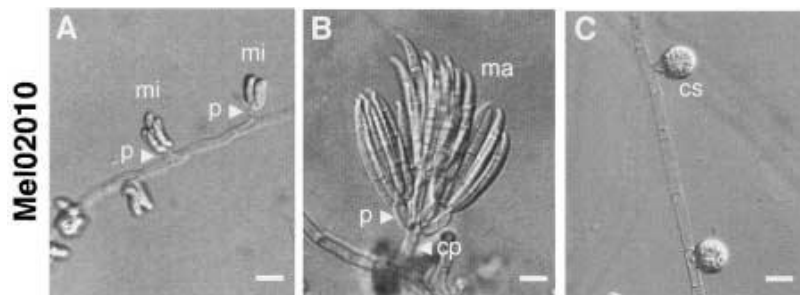


Figura 1. Conidiación de la estirpe silvestre Mel02010 perteneciente a *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Se aprecia la diferencia morfológica de los tres tipos de esporas: microconidios (A), macroconidios (B) y clamidosporas (C). (Ohara *et al.*, 2004).

Proceso de infección

El proceso de infección por *F. oxysporum* se puede dividir en diferentes fases: (1) reconocimiento de la raíz a través de señales bioquímicas procedentes del hospedador, (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 como la endodermis para la posterior proliferación en los haces xilemáticos, (4) adaptación al ambiente hostil del hospedador, (5)

producción de microconidios y (6) secreción de pequeños péptidos y fitotoxinas (Di Pietro *et al.*, 2003).

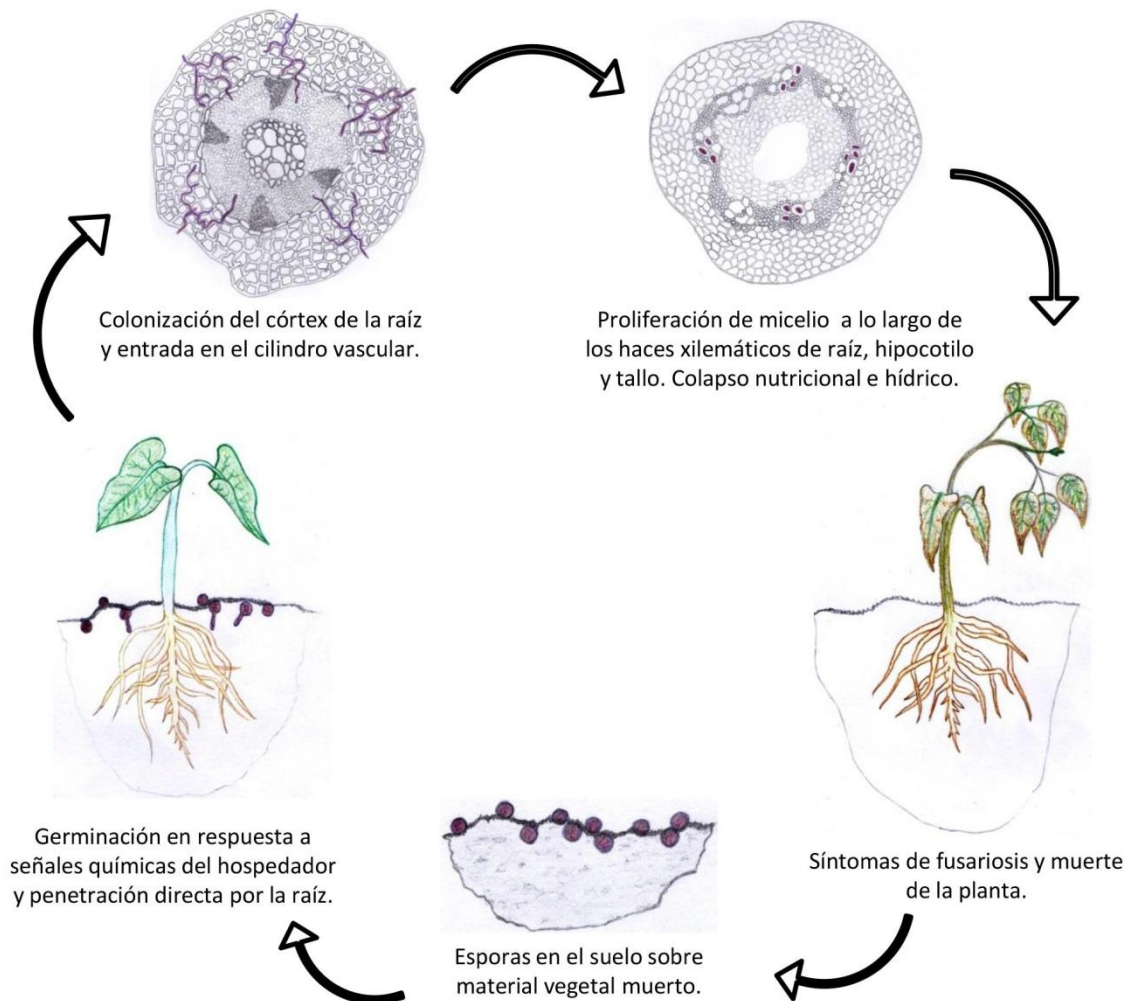


Figura 2. Ciclo de infección de *F. oxysporum*.

Las esporas en el suelo germinan en respuesta a señales bioquímicas de la planta hospedadora, como por ejemplo la actividad catalítica de las enzimas peroxidasas tipo III que son secretadas por una gran variedad de plantas (Turrà *et al.*, 2015). Las hifas empiezan a diferenciarse y penetran en las raíces sin la necesidad de la formación de una estructura de infección (Jiménez-Fernández *et al.*, 2013; Lagopodi *et al.*, 2002). Generalmente la entrada se produce a través de heridas existentes en la raíz (Nelson, 1981). En ausencia de heridas, algunos trabajos han revelado preferencias de entrada en el ápice radicular (Jiménez-Fernández *et al.*, 2013; Sarrocco *et al.*, 2007) y en las inserciones de los pelos radiculares (Lagopodi *et al.*, 2002). A partir de este

momento es imprescindible el uso de técnicas microscópicas para el seguimiento del hongo en la planta hospedadora. Los primeros trabajos relevantes fueron los desarrollados por Bishop y Cooper en la década de 1980 mediante microscopía electrónica (Bishop y Cooper, 1983a; Bishop y Cooper, 1983b; Bishop y Cooper, 1984). Actualmente es más común la observación de estirpes modificadas que expresen proteínas fluorescentes, como la GFP (*green fluorescent protein*), bajo microscopía láser confocal. Como compendio general de estos trabajos se concluye que las hifas del hongo crecen en el córtex de la raíz de manera inter e intracelular, consiguiendo puntualmente atravesar la endodermis para alcanzar los haces xilemáticos. En este momento, a través del sistema vascular, el hongo es capaz de colonizar diferentes tejidos de la planta hospedadora rápidamente.

Cuando el hongo se encuentra en los haces vasculares, el desarrollo de la enfermedad se completa con un abanico de acciones, entre otras: la producción de pequeñas proteínas efectoras, secreción de fitotoxinas, crecimiento micelial, formación de depósitos de callosa, gomas y tilosas (Beckman, 1987). Hay observaciones contrapuestas sobre la importancia de la producción de microconidios durante la infección; utilizando transformantes marcados con GFP no fueron observados ni conidióforos ni tampoco microconidios en algunos trabajos (Czymmek *et al.*, 2007; van der Does *et al.*, 2008b), así como la observación de que los mutantes delecionados en el gen *REN1*, incapaces de producir conidios sino tan sólo clamidosporas, no están afectados en la virulencia (Ohara *et al.*, 2004). Estas observaciones se contraponen a los estudios anteriores donde se destaca la relevancia de la producción de microconidios (Beckman, 1987; Di Pietro *et al.*, 2003).

Los síntomas de decaimiento, marchitez, clorosis, necrosis, pérdida prematura de las hojas, oscurecimiento y retraso en el crecimiento del sistema vascular que presenta la planta (Michielse y Rep, 2009), son el resultado del estrés hídrico causado por el colapso del xilema (Hagedorn, 1991). Cuando la planta muere, el hongo invade el tejido parenquimático por completo, produciendo esporas, en su gran mayoría clamidosporas, cerrando el ciclo de infección (Agrios, 2005).

Especificidad patógeno-hospedador. Las formas especiales.

Aunque a nivel morfológico las diferentes estirpes de *F. oxysporum* son indistinguibles, se puede establecer una clasificación de patógenos específicos: las *formae speciales* (Snyder y Hansen, 1940). Las estirpes de cada una de estas *formae speciales* son patógenos específicos de un número reducido de especies vegetales, de una especie vegetal, o incluso de una parte determinada de una especie vegetal. Hasta la fecha se conocen más de 120 ff. spp. (Di *et al.*, 2016). Dentro de una *forma specialis*, a su vez, se establece una clasificación en razas basada en la capacidad patogénica de cada estirpe sobre una serie de variedades (variedades diferenciales) de la planta hospedadora. Asimismo, dentro de una raza las estirpes son clasificadas según el grado de virulencia que presente frente al hospedador (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Kraft y Haglund, 1978; de Vega-Bartol *et al.*, 2011).

Bases genéticas de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*

Entre los genes clave para entender el proceso de infección de *F. oxysporum* es conveniente destacar primeramente el papel de genes fúngicos bien conservados en otras especies de hongos fitopatógenos. Pertenecen a esta clase los relacionados con las distintas cascadas de señalización: como son los genes codificadores de componentes de la cascada de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (PKA-APMc), los codificadores de las subunidades α de proteína G *FGA1* y *FGA2* (Jain *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2005) y subunidad β *FGB1* (Jain *et al.*, 2003); y los codificadores de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como *FMK1* (Di Pietro *et al.*, 2001) y *FOST12* (García-Sánchez *et al.*, 2010). La delección de estos genes causa una marcada reducción de la virulencia en plantas infectadas, incluso la pérdida total de patogenicidad, como es el caso de los mutantes Δ *FGA2* de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Jain *et al.*, 2005). Todo ello indica la importancia de estas rutas conservadas en el proceso de infección.

Son cruciales para el desarrollo de la infección los genes relacionados con el mantenimiento de la pared celular del hongo, como son *GAS1* que codifica una β -1,3-glucaniltransferasa (Caracuel *et al.*, 2005) y *RHO1*, codificador de una GTPasa tipo Rho

(Martínez-Rocha *et al.*, 2008); ambos implicados en la resistencia a enzimas de degradación de pared celular. Los mutantes delecionados en estos genes muestran un fenotipo de virulencia reducida en plantas de tomate.

Diversos genes previamente descritos en otras especies son necesarios para la virulencia en *F. oxysporum*. Entre ellos: *CLC1*, que codifica una proteína canal de cloruro importante en el estrés oxidativo al ser requerido para una completa actividad de enzimas lacasas (Canero y Roncero, 2008); genes codificadores de quitina sintasas: *CHSV* (Madrid *et al.*, 2003), *CHS2*, *CHSVb* y *CHS7* (Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008); genes codificadores de enzimas de degradación de pared celular (*CWDEs*) (Roncero *et al.*, 2000), algunas de ellas con expresión sujeta a represión catabólica por carbono, demostrándose mediante 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 sustratos de carbono simple y complejos, mostraron una reducción en la expresión de genes *CWDE*, lo que no permite una colonización efectiva, en los primeros estadios de la infección, de las raíces vegetales (Jonkers *et al.*, 2009).

Además de la regulación por carbono, la regulación por nitrógeno también es importante en el proceso de infección. La deleción del gen *FNR1*, codificador de un factor de transcripción considerado como regulador global de nitrógeno, provoca una disminución de la capacidad de uso de fuentes de nitrógeno secundario al no expresarse genes de nutrición que normalmente se inducen en la fase temprana de infección, dando lugar a una pérdida de virulencia (Divon *et al.*, 2006; Divon y Fluhr, 2007).

La respuesta a condiciones externas como el pH también ha sido estudiada en *F. oxysporum*. *PACC* es un gen implicado en la regulación de la cascada de respuesta a altos valores de pH, considerándose además un regulador negativo de patogenicidad (Caracuel *et al.*, 2003).

Por otra parte, el estudio comparativo de los genomas de tres especies emparentadas como *F. graminearum*, *F. verticilloides* y *F. oxysporum* ha revelado que la mayor parte del genoma está conservado en el género *Fusarium*. Sin embargo, existen regiones específicas (*Lineage-Specific genomic region, LS*) en *F. oxysporum*.

Estas regiones indican una heterogeneidad genómica no sólo entre los componentes del género *Fusarium*, sino entre las distintas formas especiales de *F. oxysporum*, e incluso se presume que entre las distintas razas de una misma forma especial (Guo *et al.*, 2014). En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) las regiones LS están ubicadas estructuralmente en cuatro cromosomas y en pequeñas regiones de otros cromosomas, en concreto un 40% del material genético total (Ma *et al.*, 2010). Estas regiones LS del genoma de *F. oxysporum* son ricas en elementos transponibles y genes con perfiles evolutivos distintos pero relacionados con patogenicidad, como son efectores secretados y factores de virulencia, factores de transcripción y proteínas involucradas en la transducción de señales (Ma *et al.*, 2010). Este mismo estudio demostró que el cromosoma 14 perteneciente a la región LS puede ser transferido horizontalmente desde la estirpe patógena 4287 de *Fol* a estirpes no patógenas de *F. oxysporum* carentes de este cromosoma, provocando la ganancia de patogenicidad hacia la planta de tomate (Ma *et al.*, 2010). El estudio de estas regiones ha empezado recientemente y se hipotetiza la posibilidad de que estén involucradas en la especificidad hospedador-huésped que muestran las distintas formas especiales de *F. oxysporum*.

Entre los factores de virulencia se incluyen los genes de avirulencia descritos en *Fol* *AVR1*, *AVR2*, y *AVR3* que son reconocidos respectivamente por los genes de resistencia (*R*) de la planta del tomate llamados *I-1*, *I-2* e *I-3*, respectivamente (Houterman *et al.*, 2008; Houterman *et al.*, 2009; Rep *et al.*, 2004).

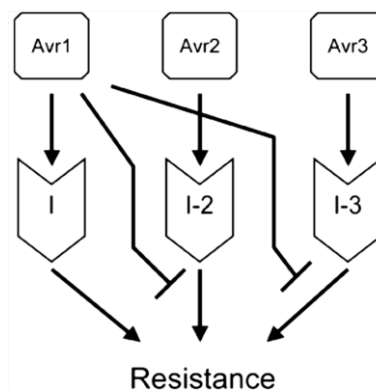


Figura 3. Resumen esquemático de las interacciones entre las proteínas AVR de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y las proteínas de resistencia de la planta *Solanum lycopersicum*. Las flechas significan activación y las líneas acabadas en cruz significan supresión. AVR1 es sinónimo de SIX4, AVR2 es sinónimo de SIX3 y AVR3 es sinónimo de SIX1. (Houterman *et al.*, 2008).

Todos estos genes de avirulencia están localizados en el cromosoma 14, perteneciente a la región *LS*. En este mismo cromosoma se han identificado otros once genes candidatos a codificar proteínas efectoras (Schmidt *et al.*, 2013). Las proteínas codificadas por estos genes se encontraron en la savia xilemática, y se denominaron proteínas SIX (SIX1-SIX14) del acrónimo inglés *Secreted In Xylem*, o secretadas en el xilema (Houterman *et al.*, 2007). Todas ellas son pequeñas (menos de 200 aminoácidos), y enriquecidas en residuos de cisteína (al menos 4) (Ma *et al.*, 2010).

La primera proteína con estas características identificada en la savia xilemática de plantas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas fue SIX1 (Rep *et al.*, 2002; Rep *et al.*, 2005), de 32 kDa, también conocida como Avr3, puesto que es reconocida por la proteína de resistencia I-3 del tomate (Rep *et al.*, 2004). Esta proteína es requerida para una virulencia completa (Rep *et al.*, 2005), aunque el modo de acción aún es desconocido (de Sain y Rep, 2015).

La proteína SIX3 o Avr2, exclusiva de la forma especial *lycopersici*, de 18 kDa, es reconocida por I-2 (Houterman *et al.*, 2009). La principal expresión de SIX3 ocurre durante el crecimiento en los haces xilemáticos y, al igual que SIX1, es requerido para la completa virulencia en las plantas de tomate (Houterman *et al.*, 2009). SIX3 es capaz de formar homodímeros que se localizan en el núcleo y en el citoplasma; también es capaz de formar heterodímeros con SIX5 localizados en el núcleo, en el citoplasma y además en la periferia celular en forma de cúmulos (Ma *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015). Aunque aún se desconoce el modo de acción de SIX3 y SIX5 en el incremento de la virulencia, se sospecha que la diferente formación de dímeros y su localización es relevante (de Sain y Rep, 2015).

La proteína SIX4 o Avr1, no es requerida para la completa virulencia en variedades susceptibles de tomate. Sin embargo, es un supresor de los mecanismos de resistencia basados en las proteínas I-2 e I-3 (Houterman *et al.*, 2008).

La proteína SIX6, de 23 kDa, no es exclusiva del género *Fusarium*, ya que también se encuentra en especies del género *Colletotrichum* (Gawehns *et al.*, 2014). Es requerida para una completa virulencia en *F. oxysporum*, cuyo modo de acción sugerido es la supresión de la respuesta defensiva de la planta mediante muerte celular (Gawehns *et al.*, 2014).

La función y fenotipo mostrado en la delección de los genes codificadores de las demás proteínas SIX (SIX2, SIX7-SIX14) aún es desconocido (de Sain y Rep, 2015).

El gen SGE1 (*SIX Gene Expression 1*), localizado en el núcleo del genoma, *core genome*, región no específica y común a las especies del género *Fusarium*, codifica para un factor de transcripción que no es requerido para la penetración y colonización radicular, pero sí para el crecimiento parasítico; siendo además imprescindible para la expresión de genes codificadores de efectores durante la infección como son los genes SIX (SIX1, SIX2, SIX3 y SIX5) (Michielse *et al.*, 2009b).

Otras familias génicas que muestran expansiones en las regiones *LS* son las correspondientes a factores de transcripción, como aquellos codificados por los genes *FOW2*, y las familias génicas *EBR* y *FTF*.

FOW2 es un gen que codifica un factor de transcripción de tipo $Zn(II)_2Cys_6$. Es un gen conservado en las formas especiales de *F. oxysporum*, ya que al menos una copia está presente en todos los genomas de las formas especiales disponibles. En el caso de la estirpe 4287 de *Fol*, el gen *FOW2* se encuentra en el cromosoma 2, y tiene dos parálogos en los cromosomas accesorios 3 y 6. Los mutantes interrumpidos en esta forma especial reducen la virulencia en torno al 50% (Michielse *et al.*, 2009a). Sin embargo en la forma especial *melonis* la interrupción provoca una pérdida completa de patogenicidad (Imazaki *et al.*, 2007).

EBR1, al igual que *FOW2*, es un gen que codifica un factor de transcripción que contiene un dominio de tipo $Zn(II)_2Cys_6$ específico de hongos. Fue caracterizado por primera vez en *F. graminearum* (Dufresne *et al.*, 2008). En esta especie, *EBR1* es necesario para un crecimiento radial normal y cuando se encuentra como patógeno en la espiga del trigo, puesto que su delección provoca una disminución de la virulencia (Zhao *et al.*, 2011). La delección del gen *EBR1* en la estirpe 4287 de *Fol* muestra un fenotipo de crecimiento limitado (Zhao *et al.*, 2011). Ocurre lo mismo para las estirpes MM10, MN-25, 007, Df023, Df038 y para la estirpe no patógena Fo47, aunque en ésta última los fenotipos encontrados son más moderados (Jonkers *et al.*, 2014).

A diferencia de *F. graminearum*, donde *EBR1* está presente como copia única, en las estirpes patógenas de *F. oxysporum* existen parálogos de este gen. En concreto en el genoma de la estirpe 4287 existen 6 parálogos (Zhao *et al.*, 2011). El gen *EBR1* homólogo al encontrado en *F. graminearum* se encuentra en el cromosoma 7, perteneciente al *core genome* mientras que las demás copias (*EBR2*, *EBR3* y *EBR4*) se encuentran todas ellas en regiones *LS* (Jonkers *et al.*, 2014). Además de un crecimiento anómalo se ha comprobado que los mutantes en *EBR1* de *Fol* muestran una virulencia reducida, así como disminución de la capacidad de biocontrol en la estirpe no patógena Fo47 (Jonkers *et al.*, 2014). Los análisis de *microarrays* muestran que tanto en *F. graminearum* como en *F. oxysporum* *EBR1* regula genes implicados en metabolismo, defensa y virulencia. Sin embargo lo hace de una manera diferente: en *F. graminearum* *EBR1* regula positivamente el metabolismo del carbono y de manera negativa a genes relacionados con la defensa; mientras que en *Fol* regula positivamente genes cuyos productos intervienen en vías de defensa celular, o son factores de virulencia, toxinas y proteínas de resistencia, y de manera negativa genes cuyos productos intervienen en el metabolismo general y en el transporte celular (Jonkers *et al.*, 2014).

Al igual que *FOW2* y los genes *EBR*, la familia génica *FTF* se encuentra en expansión en la región específica de *F. oxysporum*. Los genes *FTF* codifican también factores de transcripción con dominio de unión al ADN de tipo dedo de zinc binuclear $Zn(II)_2Cys_6$. Los genes *FTF* fueron descritos por primera vez en las estirpes muy virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Ramos *et al.*, 2007), en las cuales se encontró que *FTF1* era parte estructural de un SCAR (*Sequence Characterized Amplified Región*) diseñado para diagnóstico y detección de las estirpes muy virulentas de esta forma especial en los cultivos de *Phaseolus vulgaris* L. (Alves-Santos *et al.*, 2002b). Estudios mediante hibridaciones tipo *Southern Blot* permitieron descubrir un segundo gen homólogo a *FTF1* que estaba presente en todas las estirpes con distinto rango de virulencia e incluso en las no patógenas. Este gen, denominado *FTF2*, presenta una elevada homología con *FTF1* (83%), encontrándose altamente conservado y en forma de copia única en hongos filamentosos (Ramos, 2005). Las mayores diferencias entre los genes *FTF1* y *FTF2* no se encontraron en la región codificante, sino en la zona del

promotor donde la homología bajaba hasta el 65%, lo que explica la diferente expresión de los genes: *FTF1*, al contrario de *FTF2* tiene una expresión abundante y específica durante la colonización de la planta (Ramos *et al.*, 2007). Además, el número de copias del gen *FTF1* en las distintas estirpes de *F. oxysporum* es variable: en el caso de las estirpes de la forma especial *phaseoli* el grado de virulencia está correlacionado con el número de copias y nivel de expresión del gen (de Vega-Bartol *et al.*, 2011), mientras que en el caso de la estirpe 4287 de la forma especial *lycopersici* se han anotado 11 copias homólogas a la familia *FTF*. Una de ellas es homóloga a *FTF2* (cercano al 100% de homología), cuyo *locus* se ubica en el cromosoma 9, perteneciente al *core genome*, mientras que las demás copias homólogas a *FTF1* se ubican en *loci* pertenecientes a regiones específicas.

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_21393	6	<i>EBR2</i>	FOXG_14277	14	<i>FTF1</i>	FOXG_15059	1
<i>FOW2</i>	FOXG_12458	3	<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	15

Tabla 1. Localización cromosómica de los genes *FOW2*, *EBR* y *FTF* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En sombreado gris se destaca la copia de cada familia génica localizada en el *core genome*, y en blanco las localizadas en regiones *LS*.

Por último es preciso destacar que desde el año 2007, con el primer genoma secuenciado completo de *F. oxysporum*, es posible establecer estudios genéticos comparativos entre miembros del género *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*), y entre algunas formas especiales del complejo de especies *F. oxysporum*. La disponibilidad y el análisis de estos genomas es posible gracias al proyecto *Broad Institute* del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*). En la siguiente tabla se muestra la información relativa a los genomas secuenciados disponibles de *F. oxysporum*.

NRRL	Estirpe	Forma especial	Género hospedador	Tamaño (Mb)	Genes	Cromosomas
37622	HDV247	<i>psii</i>	<i>Pisum</i>	55,19	19623	15
54002	Fo47	(biocontrol)	-	49.66	18191	12
32931	FOSC 3-a	(humano)	<i>Homo</i>	47.91	17280	15
26381	CL57	<i>radicis-lycopersici</i>	<i>Solanum</i>	49,36	18238	*
34936	4287	<i>lycopersici</i> (raza 2)	<i>Solanum</i>	61,36	20925	15
54003	MN25	<i>lycopersici</i> (raza 3)	<i>Solanum</i>	48,64	17931	13
54005	PHW815	<i>raphani</i>	<i>Raphanus/Arabidopsis</i>	53,50	19306	*
54006	II5	<i>cubense</i> (raza tropical 4)	<i>Musa</i>	46,55	16634	*
25433		<i>vasinfectum</i>	<i>Gossypium</i>	52,91	18905	*
	Fo5176		<i>Arabidopsis</i>	54,95	21087	*
26406		<i>melonis</i>	<i>Cucurbita</i>	54,03	19661	*
54008	PHW808	<i>conglutinans</i> (raza 2)	<i>Brassica/Arabidopsis</i>	53,58	19854	*

Tabla 2. Información de la estructura genómica de las formas especiales de *F. oxysporum* secuenciadas en el proyecto *Broad Institute*. * Información no disponible.

3. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Fusarium oxysporum Schlechtend: Fr f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick y W.C. Snyder infecta plantas del género *Phaseolus* como la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el judi3n o ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), causando la enfermedad denominada traqueomicosis o fusariosis vascular. La primera descripci3n de la fusariosis vascular de la judía la realizó Harter en 1929 en California (Harter, 1929) mientras que la caracterizaci3n del pat3geno la llevaron a cabo Kendrick y Snyder (Kendrick y Snyder, 1942).

La sintomatología de la enfermedad es típica de una traqueomicosis producida por *F. oxysporum*, con la aparici3n de procesos de amarilleamiento, clorosis y decaimiento. El hongo penetra por la raíz y el hipocotilo a través de heridas y se multiplica en el tejido vascular de la planta hasta que lo colapsa.

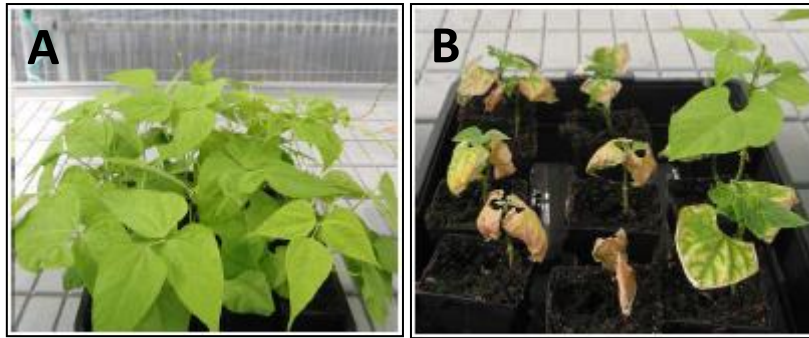


Figura 4. Comparación sintomática de plantas sanas de *P. vulgaris* (A) frente a plantas infectadas por un aislado muy virulento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (B).

Al igual que en otras *formae speciales*, en *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* es posible establecer una clasificación en razas, en función de la capacidad patógena de los aislados sobre una serie de variedades diferenciales de judía (Aloj *et al.*, 1987; Alves-Santos *et al.*, 2002a). Hasta el momento se han identificado 7 razas:

- **Raza 1.** Carolina del Sur (EE.UU.) (Ribeiro y Hagedorn, 1979).
- **Raza 2.** Brasil (Ribeiro y Hagedorn, 1979).
- **Raza 3.** Colombia (Pastor-Corrales y Abawi, 1987).
- **Raza 4.** Colorado (EE.UU.) (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-465-63-1	R	R	R	R	R	S	R

Tabla 3. Estudio de Resistencia/Susceptibilidad de variedades diferenciales de *Phaseolus vulgaris* L. frente a razas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Las interacciones resistentes (R) se corresponden a las celdas sombreadas en verde, mientras que las susceptibles (S) se corresponden con las rojas.

Los numerosos trabajos que han identificado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* como agente causal de la fusariosis vascular reflejan la amplia distribución del patógeno en diferentes partes del mundo y la importancia de esta enfermedad (Buruchara y Camacho, 2000).

Fusariosis vascular en la judía de El Barco de Ávila

España posee una amplia gama de variedades de judía cultivada, algunas de ellas muy apreciadas por sus propiedades organolépticas. Entre las variedades más valoradas se encuentran las alubias de El Barco de Ávila, acogidas a la Indicación Geográfica Protegida IGP “Judía de El Barco”, que incluye las siguientes variedades: Riojana o Blanca Riñón, Blanca Redonda, Plancheta o Planchada, Morada Larga, Morada Redonda, Arrocina y Judión de El Barco.

La comarca de El Barco de Ávila está situada en el suroeste de la provincia de Ávila, en la ladera norte de la Sierra de Gredos, a una altitud de unos 1.000 metros. Aún siendo esta zona de baja producción y pequeña la extensión de los cultivos, permanece como cultivo tradicional y posee desde 1989 la categoría de Denominación de Calidad, algo muy apreciado en los mercados gastronómicos. Quizás por esto, en la última década el cultivo ha frenado la tendencia a la baja observable en la década de los 80 y 90, incrementándose la superficie cultivada inscrita en la IGP europea hasta llegar a más de 200 hectáreas, así como la producción total, llegándose a superar los 125.000 kg (Consejo Regulador de la Denominación Específica de Judías de El Barco de Ávila).

El clima, continental muy acusado, y el tipo de suelo de esta región son determinantes para que se obtengan unas semillas tan valoradas por su sabor y textura. Los suelos son ácidos con pH que oscila entre 4,5 y 6, ligeros y bien constituidos, sin problemas de drenaje, con bajo contenido en calcio y fósforo, contenido variable en nitrógeno y potasio, alto contenido en materia orgánica y excelentes condiciones físicas de aireación y permeabilidad; esto unido a la calidad de sus aguas, exentas de cal, permiten obtener unas condiciones óptimas para la cocción y buenas propiedades organolépticas.

El problema sanitario más importante que padece el cultivo de la judía en El Barco de Ávila es la Fusariosis Vascular (Díaz-Mínguez *et al.*, 1996), producida por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Esta enfermedad es también denominada “quemada” o “rastrojera” en esta comarca. Sabemos que no se trata de una enfermedad nueva y que su importancia ya se reconoció en 1926 cuando se hizo un

estudio acerca de los daños causados en las cosechas de judías de esta zona (Benlloch y Cañizo, 1926). Muy probablemente la conjunción de suelos ácidos, la abundancia de agua para el riego y los métodos tradicionales de laboreo son los que han favorecido la gran incidencia de la enfermedad en esta comarca.

Hace quince años nuestro grupo 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, Navalonguilla, Tormellas, Bohoyo, Los Llanos de Tormes, etc.) con el fin de establecer una caracterización genética consistente de las estirpes de *F. oxysporum* capaces de infectar judía (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (Alves-Santos *et al.*, 1999; Díaz-Mínguez *et al.*, 1996) y de desarrollar métodos moleculares de diagnóstico de la fusariosis vascular ocasionada por estas estirpes (Alves-Santos *et al.*, 2002b).

Las estirpes pertenecientes a la raza 6 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* provenientes de la comarca de El Barco de Ávila muestran grados distintos de virulencia que se manifiestan en la rapidez y gravedad de los síntomas con que cursa la enfermedad vascular causada en variedades españolas de *Phaseolus vulgaris* (Alves-Santos *et al.*, 2002a). Existe un grupo de estirpes muy virulentas y otro grupo de estirpes poco virulentas, que además son distinguibles mediante un marcador genético de tipo SCAR, descubierto por nuestro grupo de investigación, que aparece en las estirpes muy virulentas, permitiendo un diagnóstico rápido de la enfermedad mediante PCR, incluso en plantas asintomáticas (Alves-Santos *et al.*, 1999; Alves-Santos *et al.*, 2002b).

4. Respuesta defensiva de la planta frente a *Fusarium oxysporum*

En el reino vegetal se han caracterizado dos sistemas defensivos de respuesta a la agresión por agentes bióticos: en primer lugar, un sistema de defensa constitutivo o preexistente y, en segundo lugar, otro de respuesta inducible. Ambos específicos de la especie vegetal en cuestión.

La respuesta constitutiva está asociada a condiciones preexistentes en la planta como son las características estructurales: cutinas, suberinas, ceras, ligninas y tricomas. También pertenecen a esta categoría compuestos del metabolismo secundario que son sintetizados de forma relativamente constante, como son algunos terpenos, fenoles, flavonoides, isoflavonoides, glucosinolatos, glicósidos, cianogénicos, y aminoácidos no proteicos, entre otros, que ofrecen defensa al ataque de patógenos (Dotor Robayo y Cabezas Gutiérrez, 2014).

Respuesta inducida

La respuesta inducida es aquella que ocurre como respuesta al ataque de un patógeno. Para su activación es necesario que la planta detecte al patógeno, lo cual ocurre gracias a la presencia de determinadas moléculas específicas de patógenos denominadas elicitores y, más recientemente, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Los elicitores suelen ser moléculas muy conservadas y esenciales para el ciclo de vida del patógeno. En el caso de los hongos se ha determinado que actuarían como tales algunos componentes de la pared celular, como la quitina, glucanos y mananos. Debido a su relevancia funcional, la variabilidad de estas moléculas es inferior al resto de moléculas del patógeno, lo que explica que hayan sido elegidas tanto por plantas como por animales como “huellas deladoras” de patógeno (Bittel y Robatzek, 2007; Nürnberger y Brunner, 2002).

En la planta se requiere que el elicitore sea detectado por un receptor. Para la interacción específica de *Fusarium oxysporum* con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se han identificado en el genoma del ecotipo Col-0 seis *loci* de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *matthioli* llamados *RFO* (Resistance to *Fusarium oxysporum*) (Diener y Ausubel, 2005). El principal y mayor contribuidor a la resistencia es *RFO1*, que además confiere resistencia a otras formas especiales como *raphani* y *conglutinans*, por lo que no se trata de una resistencia específica de raza (Diener y Ausubel, 2005). *RFO1* codifica una proteína quinasa asociada a pared celular WAKL22, perteneciente a la familia proteica de receptores semejantes a quinasas (RLK) (Johnson e Ingram, 2005). Además, se ha descrito que *RFO1* es esencial en *A. thaliana* para la resistencia frente al

hongo filamentoso *Verticillium longisporum* cuya estrategia de infección es similar a *F. oxysporum* (Johansson *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, en la interacción de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con la planta *S. lycopersicum* son importantes para el mecanismo de defensa los genes I (de inmunidad a la fusariosis). Se conocen 6 *loci*, algunos de ellos codifican proteínas de la subclase NBS-LRR (nucleotide binding site – *leucine rich repeat*). Los dominios LRR, ricos en repeticiones de leucina, están implicados en las interacciones proteína-proteína, por lo que los productos de los genes de resistencia *R* están comprometidos en la interacción directa con los productos de genes de avirulencia (*AVR*) tales como SIX1 (*AVR3*), SIX3 (*AVR2*) Y SIX4 (*AVR1*) (Houterman *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el reconocimiento del patógeno *F. oxysporum* por la planta es genéticamente complejo y variable, pudiendo ser mediado por elicitores/PAMPs o bien mediante efectores/proteínas *AVR* en un modelo clásico de interacción gen a gen (Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

Los hongos necrotrofos son capaces de producir enzimas hidrolíticas, e inducir especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte celular. Esta muerte celular permite el acceso directo del hongo a los nutrientes, por lo que *a priori* favorece el desarrollo de la infección. En términos generales, la acción del patógeno genera un flujo de iones por activación de canales iónicos, entre ellos el de calcio. El incremento de Ca^{2+} intracelular activa las enzimas NADPH oxidasas y peroxidasas que producen peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, existe discusión sobre si la producción inicial de ROS facilita o limita la progresión de la infección por *F. oxysporum*, puesto que los resultados son contradictorios. En *A. thaliana*, los mutantes que presentan muerte celular espontánea y producción de ROS debido a la sobreexpresión del gen de senescencia *SEN1* son más sensibles a la infección por *F. oxysporum* (Schenk *et al.*, 2005), mientras que en *Asparagus densiflorus* la muerte celular del tejido de la epidermis radicular y la activación de peroxidasas que producen ROS está asociada a la restricción del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* (He *et al.*, 2001). Estos resultados parecen indicar que las ROS y la muerte celular pueden tener diferentes efectos en función de la interacción o, incluso, que haya diferentes tipos de

muerte celular y tipos de especies reactivas de oxígeno que tengan papeles opuestos sobre el desarrollo de la enfermedad (Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

Ciertamente, las especies reactivas de oxígeno tienen un gran abanico de funciones directas, pero también indirectas, pues se consideran moduladores de la respuesta de defensa en conjunción con otras señales moleculares de la planta, como son el ácido salicílico (SA) y el óxido nítrico (NO) (Torres *et al.*, 2006).

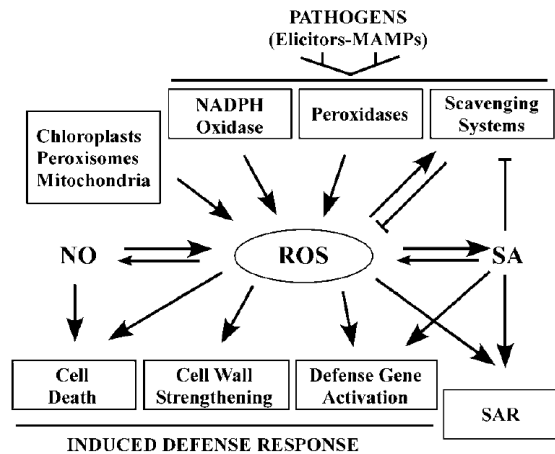


Figura 5. Producción y función de las especies reactivas de oxígeno en respuesta a patógenos (Torres *et al.*, 2006).

En la respuesta sistémica inducida son cruciales las vías de señalización transduccional mediante ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA), ya que juegan un papel en la modulación de la respuesta inmune de la planta (Glazebrook, 2005). Entre las distintas vías moleculares hay interacciones cooperativas y antagónicas, aunque hoy en día se desconoce la totalidad de éstas y su repercusión sobre la resistencia a estreses bióticos.

Se considera que la resistencia contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos está asociada con la vía dependiente de ácido salicílico, siendo el gen *PR1*, codificador de una proteína secretada, el que se utiliza como marcador de las defensas dependientes de SA (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012; Uknes *et al.*, 1992). Por el contrario, los agentes patógenos necrotrofos están asociados a la vía defensiva dependiente de etileno y jasmonato, siendo los genes *ERF1* y *PDF1.2* marcadores genéticos implicados en la resistencia (Penninckx *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012).

El ácido salicílico es considerado el principal inductor de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y causante de la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) (Durrant y Dong, 2004). La resistencia sistémica adquirida confiere protección a la planta sobre un espectro muy amplio de microorganismos. *F. oxysporum* es un inductor de la resistencia sistémica adquirida, y el ácido salicílico juega un papel importante en la resistencia de la planta frente a este microorganismo (Mauch-Mani y Slusarenko, 1994). Además se ha comprobado que las plantas tratadas con ácido salicílico antes de la inoculación con *F. oxysporum* muestran una reducción en sintomatología característica de la fusariosis (Edgar *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han utilizado mutantes de *A. thaliana* y de *S. lycopersicum* deficientes en las vías de señalización de ET (mutante ein2-5), JA (mutantes co-1 y jar1-1) y SA (mutantes NahG, sid2-1, eds1-1, eds-3, eds-4 y eds-10) en la interacción con las formas especiales *conglutinans* y *lycopersici* de *F. oxysporum*. Todos estos trabajos revelaron que estas tres vías son importantes para el control de la fusariosis producida en *Arabidopsis* y que, además, existen efectos cooperativos similares a los descritos en la resistencia de *A. thaliana* frente a patógenos como *Botrytis cinerea* o el oomiceto vascular *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007). A pesar de la función cooperativa de estas vías en la regulación de la resistencia a *F. oxysporum* por *A. thaliana*, la expresión constitutiva de algunos reguladores transcripcionales de estas vías son suficientes por sí solas, para conferir una mayor resistencia a *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2004), así como a otros patógenos vasculares (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Por ejemplo, la sobreexpresión del gen *PR1* de *Arabidopsis* en el tomate y en el trigo confiere un aumento de la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lin *et al.*, 2004) y a *F. graminearum* (Makandar *et al.*, 2006), respectivamente.

La señalización mediante ácido abscísico, además de regular el desarrollo de la planta y la respuesta a estreses abióticos, juega un papel importante en la respuesta defensiva a patógenos (Adie *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios realizados en la interacción de *Arabidopsis* con hongos necrotrofos, así como en la interacción con *F. oxysporum*, muestran una regulación negativa por ABA de la respuesta defensiva (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2003; de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

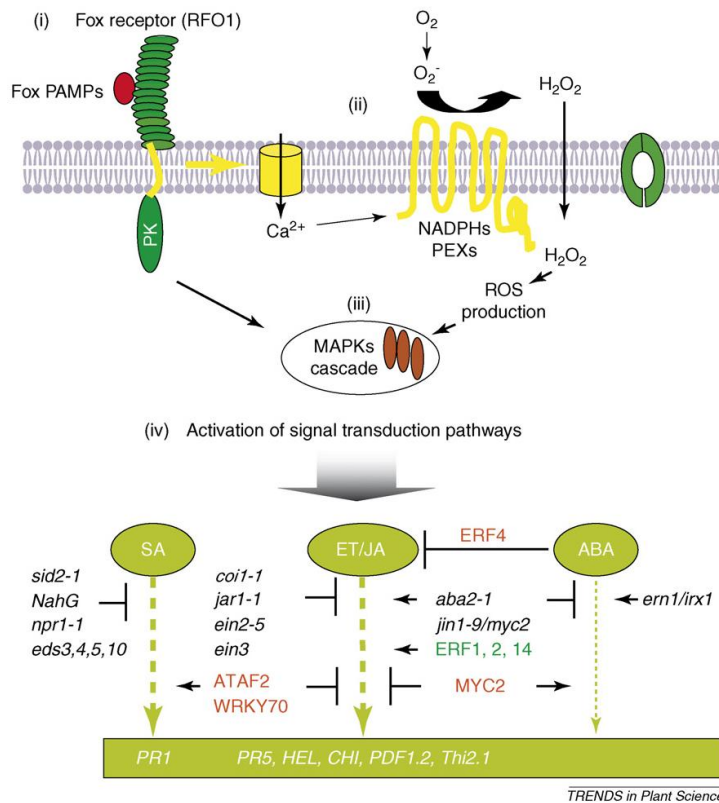


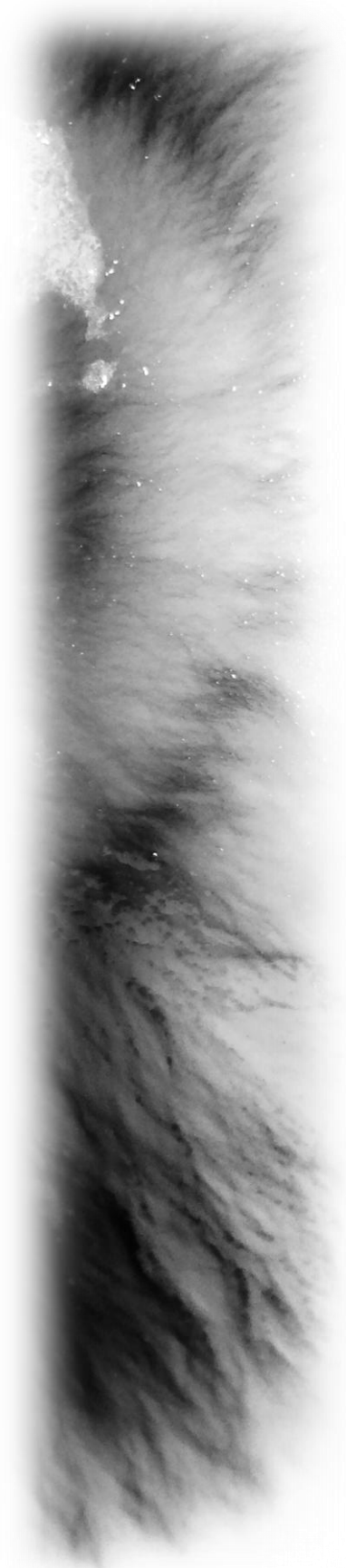
Figura 6. Red de señales de transducción implicadas en la respuesta defensiva de *Arabidopsis thaliana* frente a *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2008). Reguladores positivos como ERF1, ERF2 y ERF14 están marcados en verde, mientras los marcados en rojo se consideran reguladores negativos. Las barras en forma de T indican mutantes de *Arabidopsis* con deficiencias de señalización en la resistencia a *F. oxysporum*, mientras que las flechas indican los mutantes que muestran una mayor resistencia.

Los factores de respuesta a etileno (ERF) son proteínas que pertenecen a una familia de factores de transcripción que, en el caso de *A. thaliana*, está formada por 122 miembros (Nakano *et al.*, 2006a). Por lo general la expresión constitutiva de los miembros de la familia génica *ERF* son activadores positivos de la expresión de genes JA/ET dependientes, aumentando la resistencia contra patógenos necrotrofos (Huang *et al.*, 2015). Algunos de ellos están implicados directamente en la activación de la respuesta defensiva contra *F. oxysporum*. ERF1 fue el primer factor descrito cuya expresión era inducible por etileno, promoviendo la expresión de genes como *PDF1.2* y *PR3*, codificador de una quitinasa básica (Cheng *et al.*, 2013), que inhibe el crecimiento de microorganismos (Verburg y Huynh, 1991). Se considera un factor de transcripción integrador de las vías de respuesta al etileno y al ácido jasmónico (Lorenzo *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2006b). La expresión constitutiva del gen *ERF1* en los mutantes *coi1*, *eil1*, *ein2* y *ein3* indica una recuperación de la respuesta defensiva en *Arabidopsis*

(Solano *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2011), lo que sugiere que ERF1 actúe como regulador aguas abajo de la intersección entre las vías de ET y JA, siendo un elemento clave en la integración de ambas señales (Lorenzo *et al.*, 2003). Al igual que el gen *ERF1*, las plantas que expresan constitutivamente el gen *ERF2* son más resistentes a *F. oxysporum* que las plantas de tipo silvestre (McGrath *et al.*, 2005). Los genes *ERF1* y *ERF2* codificadores de factores reguladores de defensa están regulados a su vez por etileno mediante el factor de transcripción ERF14 (Oñate-Sánchez *et al.*, 2006). Se han descrito recientemente otros factores, como ERF5, ERF6 (Moffat *et al.*, 2012) y ERF96 (Catinot *et al.*, 2015), cuya expresión parece de gran relevancia frente a microorganismos necrotrofos como *B. cinerea*, aunque el papel frente a *F. oxysporum* está aún por determinar. Sin embargo, no todos los factores de respuesta a etileno son reguladores positivos. Así, ERF4, cuya expresión es inducible por etileno, actúa como regulador negativo, mediando interacciones antagónicas entre SA, JA y ABA (Yang *et al.*, 2005).

Otro factor de regulación negativa, independiente de la familia génica *ERF* y de la vía de ABA, es el factor de transcripción ATAF2. La sobreexpresión del gen *ATAF2* en *Arabidopsis* conduce a una mayor susceptibilidad a *F. oxyporum*, ya que bloquea la expresión de genes de defensa tales como *PDF1.2* y *PR1* (Delessert *et al.*, 2005).

Respecto a la especie *Phaseolus vulgaris*, nuestro grupo pretende dilucidar qué vías de señalización de la planta son activadas en la interacción con estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con distintos grados de virulencia. Hemos utilizado la expresión de los genes *PR1* y *PR5* como indicadores de la señalización de ácido salicílico y la expresión de los genes *ERF1* y *ERF2* como indicadores de la señalización por etileno y jasmonato. Ortólogos de estos genes descritos en *Arabidopsis* se encuentran conservados en genomas de leguminosas como *Glicine max* y *Medicago Sativa*. En la actualidad el genoma de *Phaseolus vulgaris* está disponible en la plataforma Phytozome perteneciente al JGI (*Joint Genome Institute*) (Schmutz *et al.*, 2014).



-Objetivos-

Objetivos

- 1.** Establecer diferencias en la dinámica de colonización de *Phaseolus vulgaris* entre estirpes poco y muy virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en la infección.
- 2.** Determinar patrones de expresión de genes fúngicos implicados en la patogenicidad/virulencia de *F. oxysporum*, y patrones de expresión de genes del hospedador *P. vulgaris* implicados en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico por estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con diferentes grados de virulencia.
- 3.** Estudio del fenotipo asociado al gen *FTF1* mediante la consecución de estirpes silenciadas en la familia génica *FTF*, y determinación de genes regulados por el factor de transcripción FTF1.



*-Primera
publicación-*

Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*

Jonathan Niño-Sánchez[†], Vega Tello[†], Virginia Casado-del Castillo, Michael R. Thon, Ernesto P. Benito and José María Díaz-Mínguez*

Departamento de Microbiología y Genética, Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Helio K. Takahashi,
Universidade Federal de Sao Paulo,
Brazil

Reviewed by:

Todd B. Reynolds,
University of Tennessee, USA
María Teresa González Jaén,
Complutense University of Madrid,
Spain

*Correspondence:

José María Díaz-Mínguez,
Departamento de Microbiología y
Genética, Instituto Hispano-Luso de
Investigaciones Agrarias, Universidad
de Salamanca, C/Río Duero 12,
Villamayor, 37185 Salamanca, Spain
josediaz@usal.es

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to *Fungi
and Their Interactions*, a section of
the journal *Frontiers in Microbiology*

Received: 12 January 2015

Accepted: 10 March 2015

Published: 02 April 2015

Citation:

Niño-Sánchez J, Tello V, Casado-del
Castillo V, Thon MR, Benito EP and
Díaz-Mínguez JM (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. 6:234.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00234

The dynamics of root and hypocotyl colonization, and the gene expression patterns of several fungal virulence factors and plant defense factors have been analyzed and compared in the interaction of two *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains displaying clear differences in virulence, with a susceptible common bean cultivar. The growth of the two strains on the root surface and the colonization of the root was quantitatively similar although the highly virulent (HV) strain was more efficient reaching the central root cylinder. The main differences between both strains were found in the temporal and spatial dynamics of crown root and hypocotyl colonization. The increase of fungal biomass in the crown root was considerably larger for the HV strain, which, after an initial stage of global colonization of both the vascular cylinder and the parenchymal cells, restricted its growth to the newly differentiated xylem vessels. The weakly virulent (WV) strain was a much slower and less efficient colonizer of the xylem vessels, showing also growth in the intercellular spaces of the parenchyma. Most of the virulence genes analyzed showed similar expression patterns in both strains, except *SIX1*, *SIX6* and the gene encoding the transcription factor *FTF1*, which were highly upregulated in root crown and hypocotyl. The response induced in the infected plant showed interesting differences for both strains. The WV strain induced an early and strong transcription of the *PR1* gene, involved in SAR response, while the HV strain preferentially induced the early expression of the ethylene responsive factor *ERF2*.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, *Phaseolus vulgaris*, confocal microscopy, virulence, effector

Introduction

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr. is an anamorphic species complex (FOSC) 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. The pathogenic strains collectively may infect more than 100 different hosts, ranging from globally important crops such as cotton, tomato, banana, and several legumes to immunocompromised patients (Nucci and Anaissie, 2007; Michielse and Rep, 2009). Despite the broad host range at the species

complex level, the individual isolates are able to infect only one or a few plant species. This allows for a classification into formae speciales based on host-specificity (Booth, 1971; Armstrong and Armstrong, 1975), making the *F. oxysporum* species complex a very attractive system for the study of the relationships between pathogenicity, virulence and host-specificity. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* infects some species of the genus *Phaseolus*, mainly *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus* (de Vega-Bartol et al., 2011), and is one of the principal agents limiting dry bean production worldwide.

The cellular basis of the host-pathogen interaction in vascular wilt diseases was first described using transmission electron-microscopy (Bishop and Cooper, 1983). The use of laser scanning spectral confocal microscopy (CLSM) has improved our knowledge of the details concerning infection in multiple hosts and different races of the pathogen. The majority of studies show that invasion of the host by *F. oxysporum* strains expressing the green fluorescent protein (GFP) begins with the development of a hyphal network around root hairs and the upper part of taproot, followed by penetration and colonization of the root epidermis. Once the hyphae are inside the roots the development

TABLE 1 | Oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotides	Ace. No.*	Oligonucleotides sequence	Amplicon size (bp)
B310User	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCAGCCATTCAT GGATGACATAACGAATTC	670
5FTF1RBamHI		GGATCCGGCTCTGCCAGAGACAAAGTTAC	
5GFPFBamHI	gGFP ⁺	GGATCCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAG	782
GFPUserR		GGACTTAAUCCAGATTCGTCAGCTGTTTG	
EBR1-F	FOXG_05408 ^b	ACCACCGACAGCAACAGCAGC	155
EBR1-R		GTTGGGTCGGCGTTGATCCTC	
FNR1-F	DQ387858 ^a	CCAGCAGTTTCATGTATGGTGGCG	136
FNR1-R		CACCTGAGAGGGGTCGATATGCC	
FOW2-F	AB266616 ^a	CAAATCCTTCGCCCTCACATCTG	130
FOW2-R		GATCCTGGTGTCAAAGCCGAGG	
FTF1-F	DQ280313 ^a	TGTGGTGGCCAGGATATGATG	110
FTF1-R		TGCATGCCTGCCTTGACAT	
FTF2-F	FOXG_09390 ^b	ATGCTCACACCCCCACATTCT	108
FTF2-R		ATCCCCAAAGACAAGCTGAC	
PacC-F	AY125958 ^a	CATGGCAACCTCTCCGTTCC	132
PacC-R		GGGCAGGTAGTATTGCTGAGCCG	
RHR1-F	FOXG_05541 ^b	CCATGCTGAGATTCTCCACGGC	175
RHR1-R		CATGACAGGATCGGTTTGGGGTG	
RHR2-F	FOXG_09999 ^b	CAAGTGGATGGGAGACCTACGCC	158
RHR2-R		TGAGCCTGCATTGGCGATTGG	
SGE1-F	FOXG_10510 ^b	CAGCCGTATCCTTGGCAACTA	101
SGE1-R		TGGTTGACTTGCCGTTCTT	
SIX1-F	AJ608702 ^a	GAGCCGCCTCAATCGCCTG	194
SIX1-R		GCCCAAGTTGCGGATATGTG	
SIX6-F	ACY39286.1 ^a	GCTTTTGGTGGCGAACC	102
SIX6-R		TTTTCCCGTTGCTGAGATTGCG	
PR1-F	Phvul.003G109100 ^c	CAGGCACTACACTCAGGTTGTTGGA	111
PR1-R		TTGCCAGGAGGAGCATAGTTGCAA	
PR5-F	Phvul.001G016700 ^c	CGGAAAATGTGTCACCGGAGACTG	148
PR5-R		ATTGTAACCGTCCACAGGCTCAC	
ERF1-F	Phvul.007G127800 ^c	CCTGTTGTGGCTCTGAAGAGGAAAC	124
ERF1-R		CAGGACCAAGGTCTTCAAACACGAC	
ERF2-F	XM_003549886 ^d	GGGAAAGTTGCGGCGGAG	164
ERF2-R		CGGAGTTAACCTCAACGGAAAATTC	
EF1alpha-F	FOXG_03515 ^b	CATCGGCCACGTCGACTCT	144
EF1alpha-R		AGAACCCAGGCGTACTTGAA	
Actin-F	Phvul.011G064500 ^c	GAAGTTCTTCCAACCATCC	175
Actin-R		TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	

*GeneBank numbers ^(a) or loci numbers of the *F. oxysporum* genome ^(b) sequence (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html), the *P. vulgaris* genome ^(c) (<http://www.phytozome.net/commonbean.php>) or the *Glycine max* genome ^(d) (<http://www.phytozome.net/soybean.php>) are provided, except ⁺plasmid gGFP.

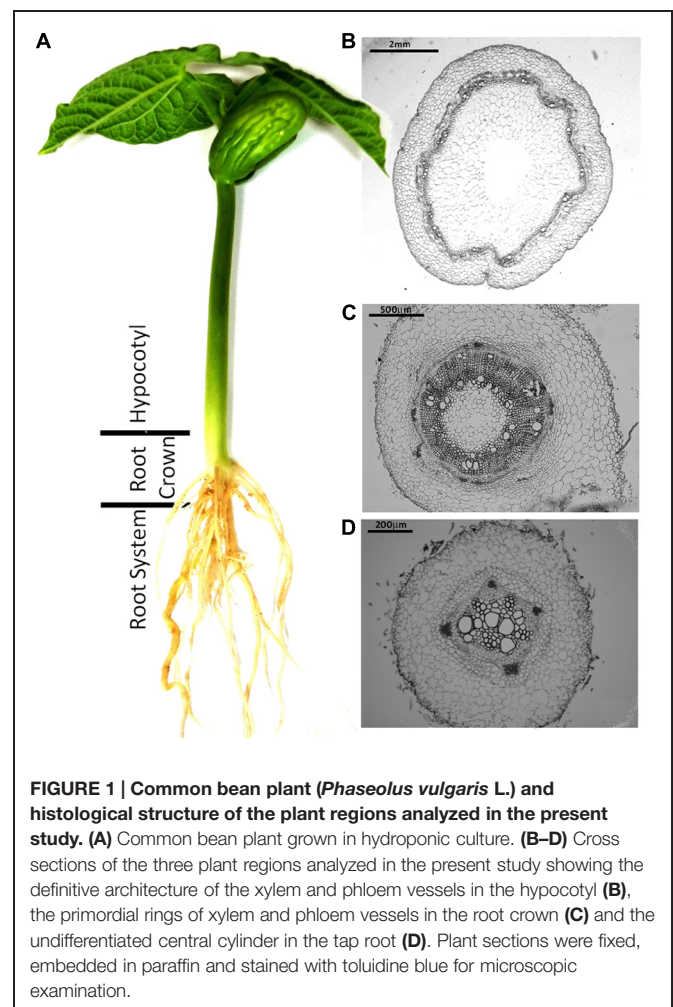
TABLE 2 | Fungal genes analyzed during colonization of *Phaseolus vulgaris* plants by weakly and highly virulent strains of *F. oxysporum*.

Gene	Ace. No ^a	Product ^a	Effect of gene inactivation	Reference
<i>EBR1</i>	FOXG_05408 ^b	TF	Reduced virulence; impaired growth; reduced biocontrol capacity	Zhao et al. (2011)
<i>FNR1</i>	DQ387858 ^a	TF	Reduced virulence; reduced ability to use secondary nitrogen sources	Divon et al. (2006)
<i>FOW2</i>	AB266616 ^a	TF	Non-pathogenic; impaired in invasive growth	Imazaki et al. (2007)
<i>FTF1</i>	DQ280313 ^a	TF	Reduced virulence	Ramos et al. (2007), Niño-Sánchez (unpublished)
<i>FTF2</i>	FOXG_09390 ^b	TF	Unknown; homologue of <i>FTF1</i>	Ramos (2005)
<i>PacC</i>	AY125958 ^a	TF	Increased virulence and expression of acid-expressed genes	Caracuel et al. (2003)
<i>RHR1</i>	FOXG_05541 ^b	TF	Impaired to use L-rhamnose as carbon source	Pardo and Orejas (2014)
<i>RHR2</i>	FOXG_09999 ^b	TF	Unknown	Orejas (pers. comm)
<i>SGE1</i>	FOXG_10510 ^b	TF	Non-pathogenic; reduced sporulation	Michielse and Rep (2009)
<i>SIX1</i>	AJ608702 ^a	SSP	Reduced virulence (more pronounced in older plants)	Rep et al. (2004)
<i>SIX6</i>	ACY39286.1 ^a	SSP	Reduced virulence	Gawehns et al. (2014)

^aGenBank accession numbers (^a) or loci numbers of the *F. oxysporum* genome sequence (^b) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html) are provided. +TF, transcription factor; SSP, small secreted protein.

of disease symptoms and degree of colonization in resistant and susceptible cultivars show differences in several hosts. *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* colonizes the cortex and central cylinder of roots of resistant and susceptible cultivars in similar ways. In *Medicago truncatula* inoculation of a resistant cultivar resulted in the delay of symptom development and reduction of the disease severity with respect to the inoculation of a susceptible cultivar, but no correlation could be found with the degree of colonization of the root parenchyma and central cylinder (Ramírez-Suero et al., 2010). In watermelon, the pathogen can colonize the lateral roots in compatible interactions, but it is unable to penetrate the taproot when infecting a resistant cultivar (Lü et al., 2013). A more complex interaction has been recently reported in the infection of chickpea with *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. In compatible interactions the pathogen grows intercellularly in the root cortex, reaches the xylem and then advances upward through the xylem of the stem (Jiménez-Fernández et al., 2013). All the incompatible interactions were asymptomatic, but a race 0 strain was able to colonize the xylem vessels of root and stem of the resistant cultivar JG-62, while in another resistant cultivar, WR-315, it was halted in the intercellular spaces of the root cortex failing to reach the xylem. However, a race 5 strain progressed up to the hypocotyl in the same resistant cultivar WR-315 (Jiménez-Fernández et al., 2013). Therefore, colonization of xylem vessels does not guarantee a compatible interaction, at least in chickpea.

All the examples described above are based on the analysis of host-specificity (*formae speciales*) and cultivar specificity (races). Much less attention has been paid to interactions involving more virulent or less aggressive strains, even though virulence is often the only difference between a devastating and a tolerable disease. Previously, we characterized several groups of virulence in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and demonstrated that virulence is not correlated with race, because strains that belong to the same race may display different virulence on the same common bean cultivar (Alves-Santos et al., 2002a). However, virulence depends in part on the host, because equally virulent strains on *P. vulgaris* show differences in virulence on *P. coccineus* (de Vega-Bartol et al., 2011). We have also shown that some virulence factors are specific to highly virulent (HV) strains (Alves-Santos et al.,



2002b) and specifically induced *in planta* (Ramos et al., 2007). In the only confocal microscopy study reported to date involving strains of *F. oxysporum* differing in virulence, we obtained evidence about the importance of the speed of xylem vessel colonization as a determinant of disease severity (García-Sánchez et al.,

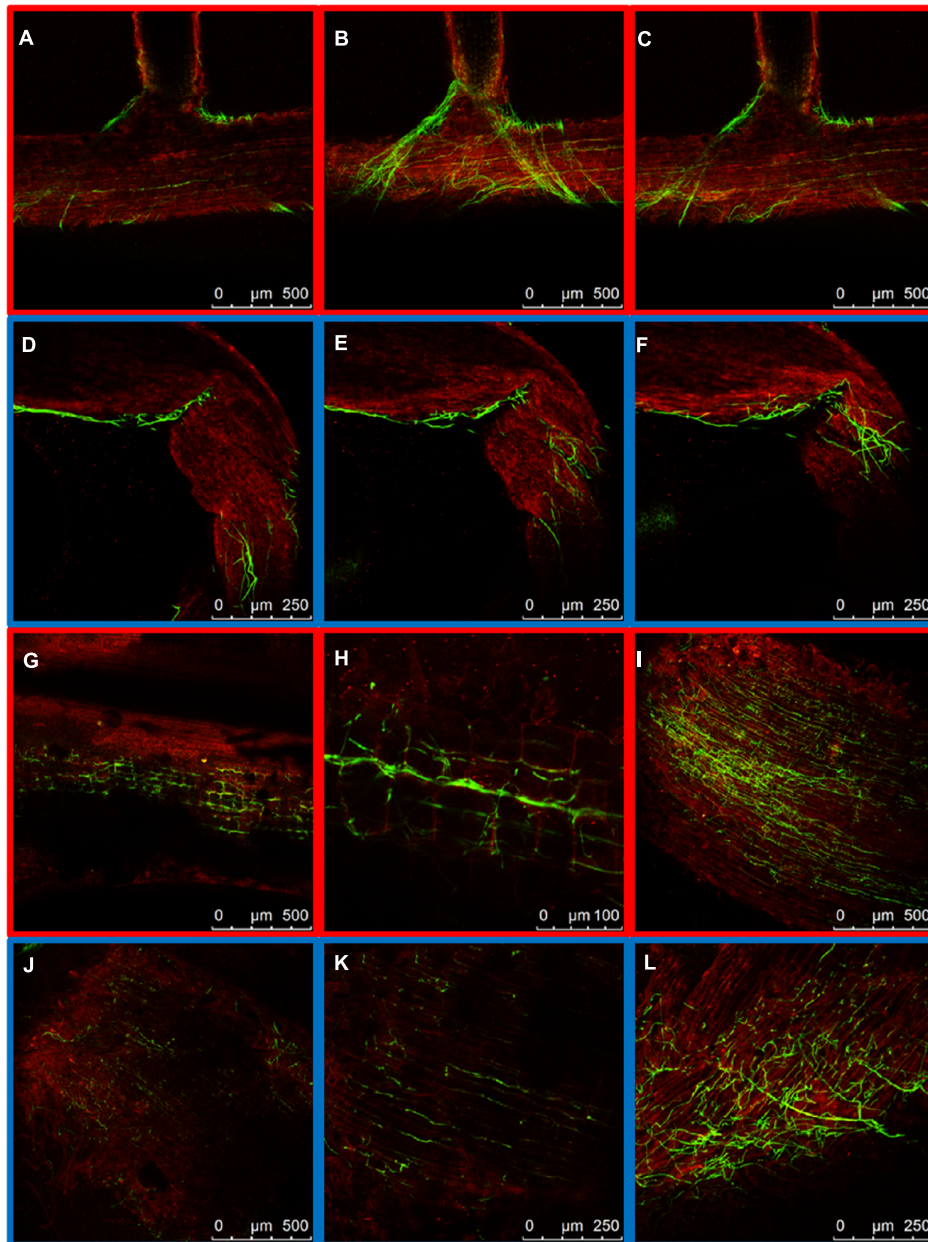


FIGURE 2 | External colonization of the root system by highly virulent (HV; FOP-SP1) and weakly virulent (WV; FOP-SP4) *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains. Colonization of the taproot and lateral roots of plants inoculated with the HV strain FOP-SP1 (red framed images) and the WV strain FOP-SP4 (blue framed images) was visualized by confocal

laser scanning microscopy 1–3 days post inoculation (dpi). **(A–C)** FOP-SP1 mycelium growing in the junction of a lateral root with the taproot. **(D–F)** FOP-SP4 mycelium growing in an interstitial zone of a lateral root. Intermediate root zones showing epidermis colonization by FOP-SP1 hyphae **(G–I)** and FOP-SP4 hyphae **(J–L)**.

2010). This analysis left open some important questions related to the differences in colonization between HV and weakly virulent (WV) strains. For example, do HV strains develop a higher amount of fungal biomass inside the host than WV strains? What are the spatial milestones of colonization that differentiate both types of strains? Finally, if there is a differential expression of fungal virulence factors and plant defense factors, when does it happen?

In this work we addressed the above questions by determining the qualitative and quantitative differences on the spatial and temporal dynamics of colonization of a susceptible common bean cultivar infected by WV and HV strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the gene expression patterns of several fungal virulence factors, and the host defense response involving expression of genes related to the salicylic acid (SA) defense induced response and the ethylene (ET)/jasmonic mediated

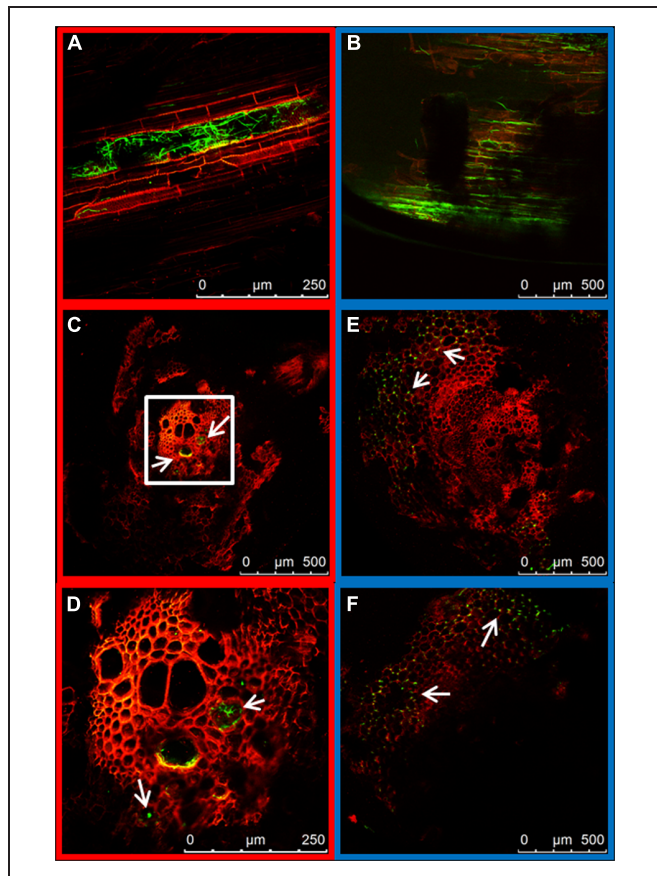


FIGURE 3 | Internal colonization of the root system by HV (FOP-SP1) and WV (FOP-SP4) *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains. Mycelial growth of FOP-SP1 and FOP-SP4 inside the taproot was visualized in longitudinal sections (A,B) and cross sections (C–F) of infected plants 1–3 dpi. The arrows indicate hyphae of FOP-SP1 growing inside the vessels of the central cylinder of the taproot (red framed images) and hyphae of FOP-SP4 colonizing the cortex of the taproot (blue framed images).

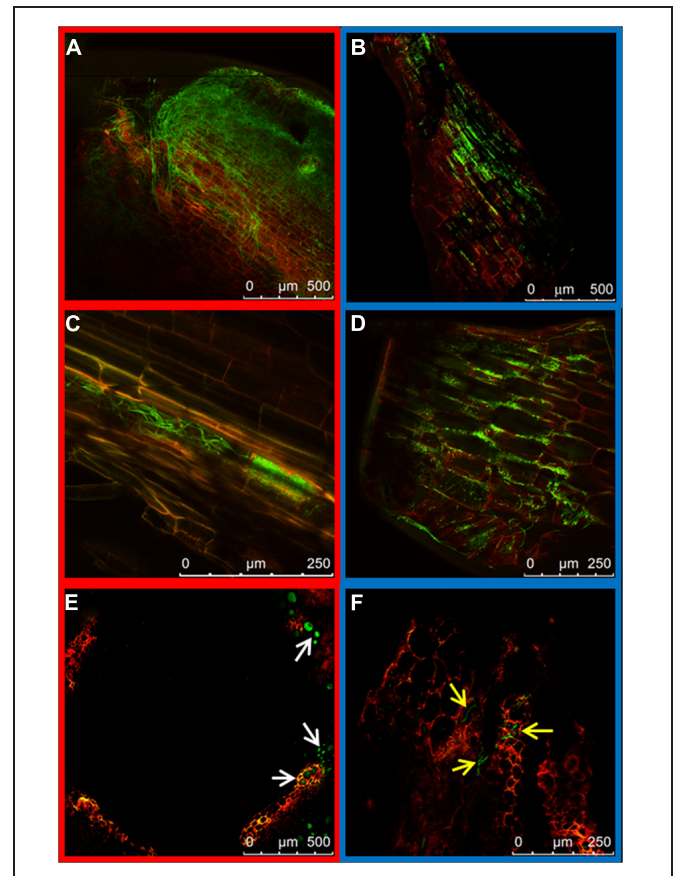


FIGURE 4 | Colonization of the root crown by HV (FOP-SP1) and WV (FOP-SP4) *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains. The growth of mycelium of FOP-SP1 and FOP-SP4 in the root crown region was visualized in longitudinal sections (A–D) and cross sections (E,F) of plants at 5–7 dpi. The hyphae of FOP-SP1 heavily colonized the cortex (A) and the xylem vessels (C and white arrows in E) of the root crown. The growth of hyphae of FOP-SP4 in the root crown predominantly occurred along the interstitial spaces of cortical cells (B,D) although some hyphae also colonized the xylem vessels (yellow arrows in F).

response. Systemic acquired resistance (SAR) confers protection against a broad spectrum of microorganisms. SAR requires the signal molecule SA and is associated with accumulation of pathogenesis-related proteins (PRs; Durrant and Dong, 2004). Also, the cross-talk between ET and jasmonate (JA) signaling pathways determines the activation of defense responses against pathogens.

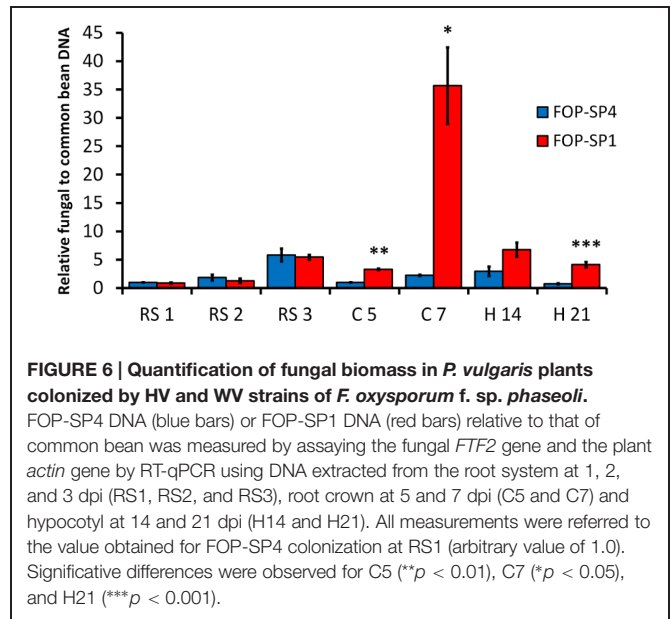
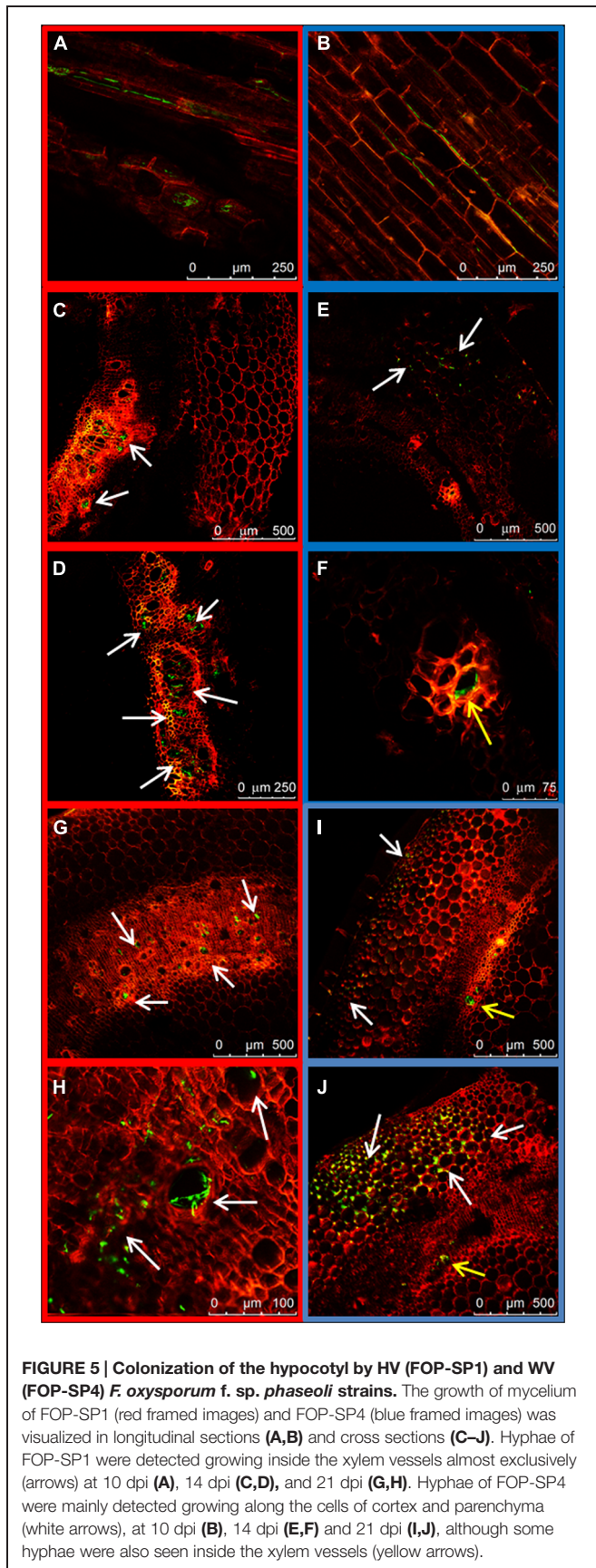
Materials and Methods

Fungal Strains and Culture Conditions

The *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains FOP-SP1 (HV) and FOP-SP4 (WV) used in this study have been described (Alves-Santos et al., 1999, 2002a). All strains were grown as previously described (Alves-Santos et al., 1999). Fungal cultures were established from frozen mycelia stored on 25% glycerol (v/v) at -80°C , and incubated at 25°C with continuous light for 1 week (solid media) or 5 days at 120–180 rpm (liquid cultures).

Development of GFP-Expressing Strains of *F. oxysporum*

Plasmid pRF-HU-GFP was constructed to express GFP in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A 3.1 Kb fragment containing the sGFP gene under the control of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter of *Aspergillus nidulans* was excised from plasmid gGFP (Maor et al., 1998; Sukno et al., 2008) by digestion with *Xba*I and *Cla*I. This 3.1 Kb *Xba*I-*Cla*I fragment was blunt-ended using the Klenow fragment of T4 DNA polymerase and ligated into the binary vector pRF-HU (Frandsen et al., 2008) digested with *Pac*I and also blunt-ended. Plasmid pRF-HU-PFTF1GFP was designed to express GFP under the control of the *FTF1* promoter (*PFTF1*). The pair of primers B310User-5FTF1RBamHI (Table 1) was used to amplify a 670 bp DNA fragment containing the promoter of gene *FTF1* using genomic DNA of strain FOP-SP1 as template. In parallel, primers 5GFPFBamHI and GFPUserR were



used to amplify the coding region of sGFP using as template the plasmid gGFP. Both PCR amplification products were digested with *Bam*HI (as recognition sequences were included in one of the primers of each pair) and then ligated using T4 DNA ligase. 100 μ l of the ligation reaction were used as template to amplify the cassette PFTF1::GFP. The primers used to this end (B310User and GFPUserR) included the sequences needed to ligate the PCR product to plasmid pRF-HU digested with *Pac*I and *Nt.Bbv*CI USERTM enzymes (Frandsen et al., 2008). Both plasmids, pRF-HU-GFP and pRF-HU-PFTF1GFP, were used to genetically transform *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* by means of the *A. tumefaciens*-mediated transformation procedure as previously described (Mullins et al., 2001; Ramos et al., 2007).

Pathogenicity Tests

Inoculation of *P. vulgaris* L. cv Blanca Riñón with conidia from the *F. oxysporum* strains tested was mainly carried out as previously described (Alves-Santos et al., 1999). After inoculation, the plants were either transferred to pots and further incubated in a greenhouse for regular pathogenicity tests, or to 50 ml Falcon tubes filled with PGM (Plant Growth Medium) solution and covered with foil. These hydroponic cultures were incubated in an environment-controlled chamber at 25°C and relative humidity of 60–80% with a 16 h photoperiod fluorescent light. All the strains and transformants were simultaneously tested in each inoculation experiment to reduce variability in the plant response due to environmental conditions. Pathogenicity tests were repeated three times and 12 replica plants were included per treatment.

External symptoms of disease in plants grown in Falcon tubes could not be correlated with those previously recorded using the CIAT scale in plants grown in pots, as growth of the plants under the hydroponic conditions used was slower. However, distinctions could be made between plants inoculated with the HV or

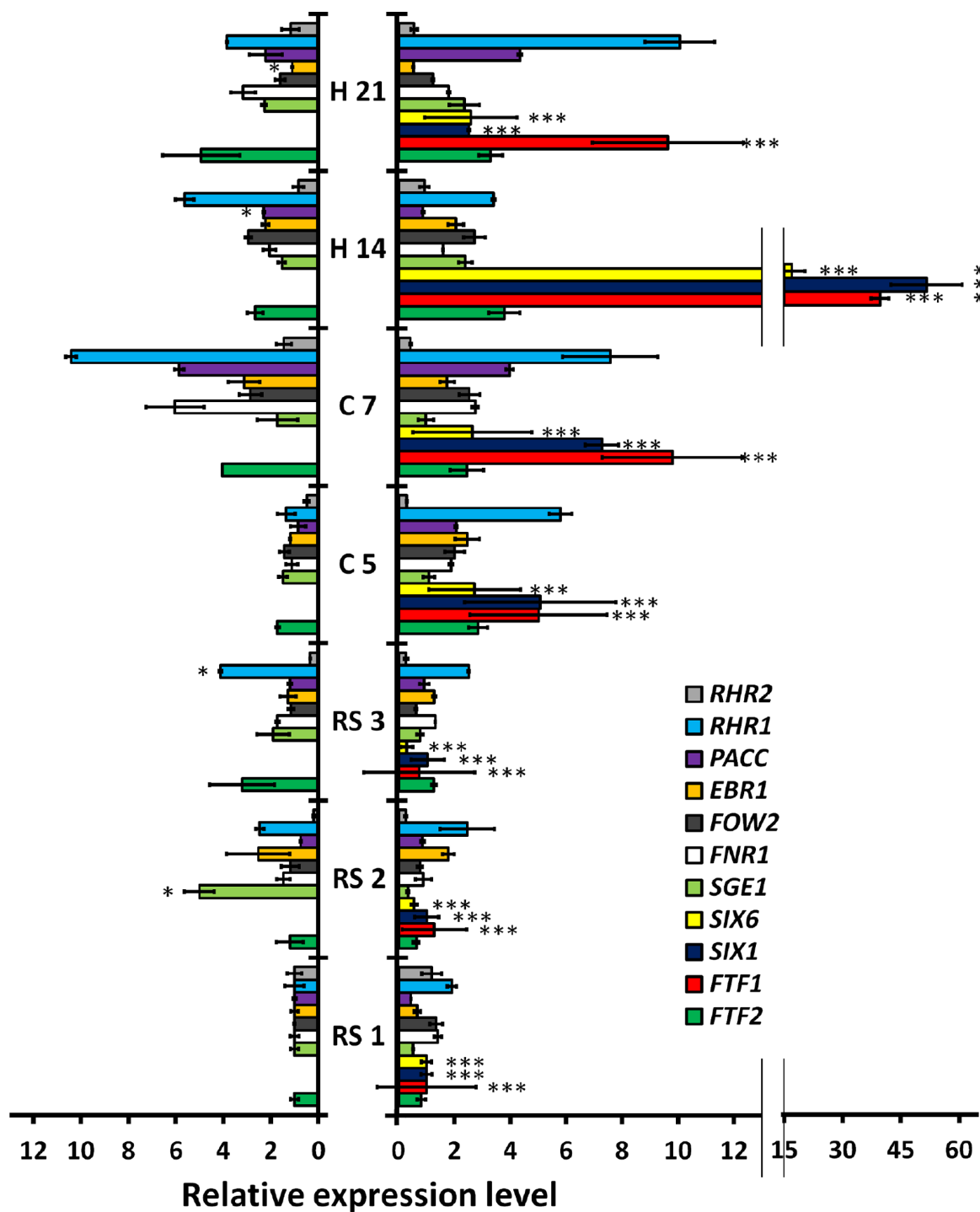
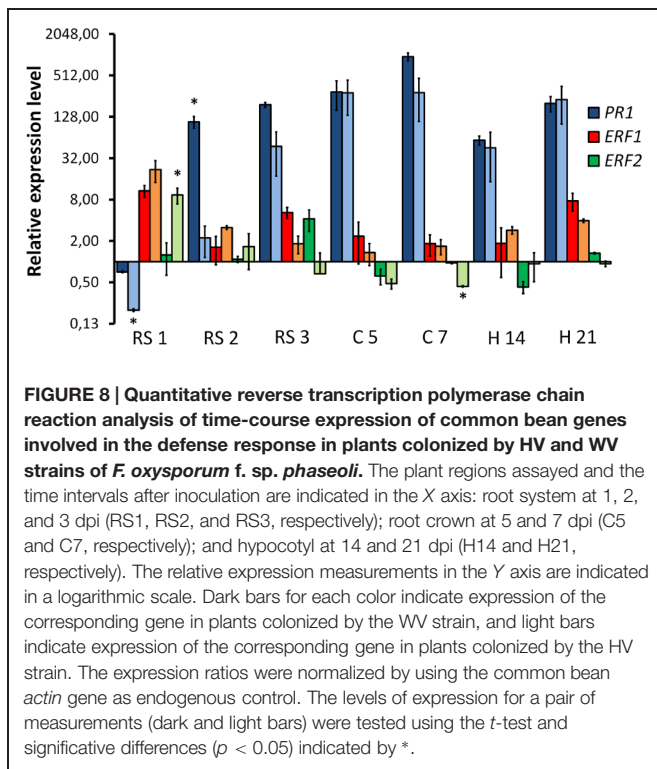


FIGURE 7 | Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of time-course expression of eleven fungal genes in *P. vulgaris* plants colonized by HV and WV strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. The plant regions assayed and the time intervals after inoculation are indicated in the center of the figure: root system at 1, 2, and 3 dpi (RS1, RS2, and RS3, respectively); root crown at 5 and 7 dpi (C5 and C7, respectively); and hypocotyl at 14 and 21 dpi (H14 and H21, respectively). The bars on the left show the results obtained in common bean plants colonized by the WV strain (FOP-SP4). The bars on the right show the corresponding results for plants colonized by the HV strain (FOP-SP1). The

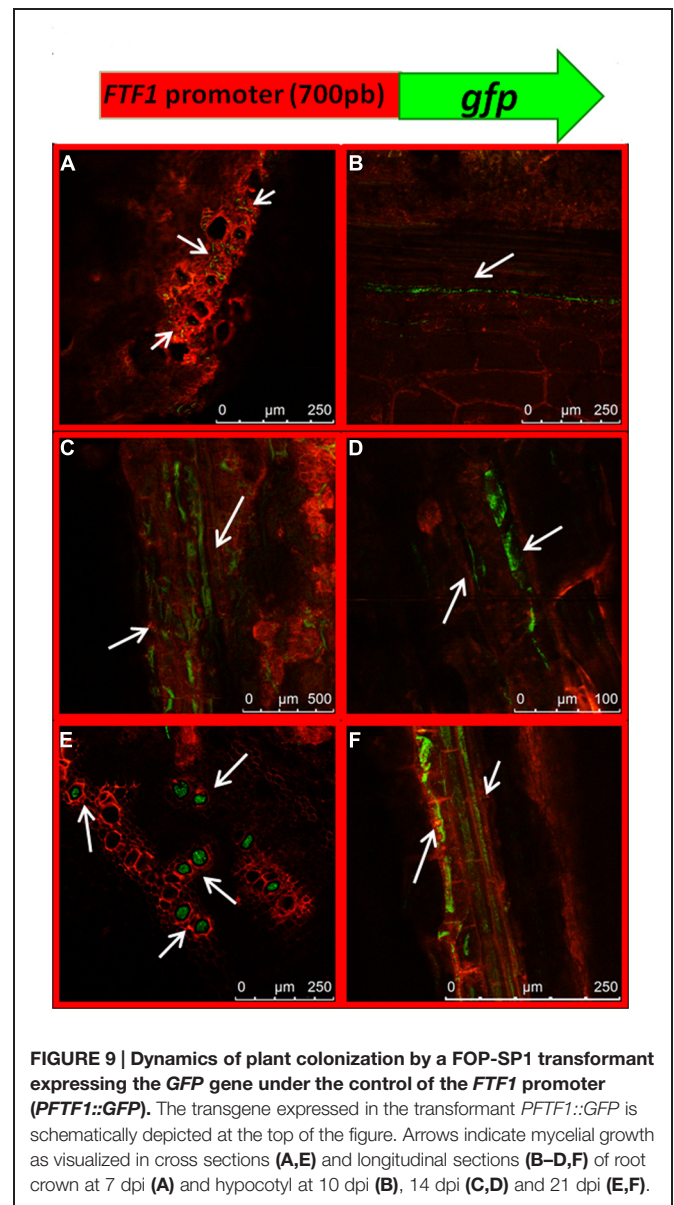
expression ratios were normalized by using the fungal *EF1α* gene as an endogenous control. An arbitrary value of 1.0 was denoted for the transcript level of each gene in plants colonized by the WV strain at RS1, except for the FTF1, SIX1, and SIX6 transcripts whose 1.0 values correspond to the transcript level of each gene in plants colonized by the HV strain at RS1. The results shown are the averages and their respective standard deviations obtained in three independent biological experiments. The expression level value differences between each pair of samples (the expression of the same gene in plants colonized by the HV strain or the WV strain) were tested using the *t*-test and indicated by (**p* < 0.05) and (***p* < 0.01).



the WV virulent strains, both in the number of chlorotic leaves and the degree of necrosis in the vascular system. A new scale was designed according to the degree of external (chlorotic leaves) and internal (necrotic lesions) symptoms observed. 0: healthy plant with no symptoms of chlorosis or necrosis; 1: plant with no chlorotic leaves but light necrotic lesions; 2: plant with some chlorotic leaves and necrotic lesions in the crown region and the xylem system; 3: plant with most of the leaves either chlorotic or dead, extensive necrosis of the crown region and necrosis of the vascular system; 4: dead plant.

Microscopic Examination by Means of Confocal Laser Microscopy

The plants inoculated with FOP-SP1 or FOP-SP4 and the controls treated with water were maintained in hydroponic cultures and examined each day for a period of 21 days after infection. For the examination of histological structure plant sections were fixed and embedded in paraffin as described (Jiménez et al., 2007), and then stained with toluidine blue 0.1% in potassium phosphate buffer 0.1 M pH 6.8. For CLSM analysis the plants were taken from the Falcon tubes and the roots washed in sterile distilled water. Plant sections or longitudinal samples 1 mm in thickness were manually sliced with a razor blade from the following tissues: root hairs, tap root zones (apex, intermediate, upper), crown and hypocotyl. Plant tissues were stained with a drop of propidium iodide (SIGMA) at a concentration of 10 mg/ml for 15 min and the excess propidium iodide was removed by washing with sterile distilled water. Then, samples were placed on microscope slides, submerged in glycerol 50% (v/v) and gently squashed with a cover glass. Microscopic



analysis was performed using a laser scanning spectral confocal microscope (TCS2-SP2, Leica Microsystems, Germany). Excitation was provided by an argon laser (488 nm). Fluorescence of GFP was detected at 495–520 nm and plant tissue fluorescence (either propidium iodide stained and autofluorescence) at 595–680 nm.

The quantification of xylem vessel colonization was performed with the help of ImageJ. Data were obtained from at least six images per plant section showing growing hyphae of the HV strain or the WV strain. Parenchyma and xylem vessels were compared and GFP cell fluorescence was used to estimate the ratio of fungal colonization of similar areas in both tissues.

Nucleic Acid Manipulations

Genomic DNA was extracted from *F. oxysporum* mycelium according to the procedures previously described (Alves-Santos

et al., 1999, 2002b; Ramos et al., 2007). RNA was extracted from *P. vulgaris* plants at different times after inoculation with *F. oxysporum* strains. Roots and hypocotyls were cut, immediately frozen at -80°C and ground in a mortar with pestle under liquid nitrogen. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNAase Turbo DNA-free (Ambion Inc., Austin, TX, USA), tested for integrity by running samples in agarose gels and quantified using a Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Southern blots were carried out as described previously (Ramos et al., 2007). DNA probes were labeled with digoxigenin-dUTP (Roche Diagnostics) by the PCR method using the Biotools DNA polymerase (Biotools SA, Spain) and plasmid pFR-HU-GFP DNA as template. Prehybridization, hybridization, washings, and detection were performed using a chemiluminescent detection procedure using CDP-Star (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's recommendations.

Real-Time Quantitative Analysis of Gene Expression

Samples of plants inoculated with *F. oxysporum* were collected and frozen at -80°C . Total RNA was extracted as described before. cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA in 20 μl (total volume) reactions using the PrimeScriptTM RT reagent kit (Takara Biosystems), and oligo (dT) as a primer, according to the manufacturer's procedure.

The primer pairs used in RT-qPCR assays are shown in **Table 1**. Primer pairs used to analyze the expression of *F. oxysporum* genes were designed according to alignments performed using all the *F. oxysporum* genome sequences available at the Broad Institute database. They were verified in PCR experiments using genomic DNA from FOP-S1 and FOP-SP4 as template. All of them were able to amplify DNA fragments of the expected size in both strains, except the fragment corresponding to *FTF1*, as this gene is specific of HV strains. The amplicons were sequenced to verify their identities. Primer pairs used to analyze the expression of plant genes were designed on the basis of the *Glycine max* sequences. The amplicons obtained using common bean DNA as template were sequenced to confirm that they were homologues of the *G. max* genes. Before using a pair of primers in an expression analysis, its PCR amplification efficiency was calculated using six serial dilutions of cDNA as template. All the primer pairs tested showed efficiencies greater than 97%. qPCR was carried out in 10 μl reaction mixtures containing 1X KAPA SYBR Green qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 500 nM forward and reverse primers and 1 μl of the reverse transcription reaction. Amplifications were performed in a StepOnePlusTM Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the thermal profile recommended by the manufacturer (40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s). The presence of only one specific peak was checked in the melting curve (dissociation curve), which was run at 0.5°C increments every 5 s within a range of $55\text{--}95^{\circ}\text{C}$. The qPCR product size was checked by electrophoresis in 2.5% (w/v) agarose gels that were stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Two or three sets of samples from different infection assays were used (biological replicates). Two independent cDNA preparations per biological replicate were obtained, and three replicas of each cDNA were analyzed. The endogenous reference genes used were the *F. oxysporum EF1a* encoding a translation elongation factor and the common bean actin gene. The expression of both genes was found to remain constant under all the conditions used in the present study (data not shown). Relative expression levels were calculated using the comparative cycle threshold (Ct) method (Bustin, 2000; Pfaffl et al., 2002), using the formula $\text{RQ (relative quantity of transcript)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, where $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{specific gene}} - \text{Ct}_{\text{reference gene}}$ of any given sample, and $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (as previously calculated) $- \Delta\text{Ct}$ of 1 dpi FOP-SP4 inoculated samples, when specific fungal genes were analyzed, or ΔCt of mock inoculated plants, when plant genes were analyzed. All Ct calculations, integration of the amplification efficiency data and statistical analyses were performed using StepOneTM Software V2.2.2.

Fungal Biomass Quantification

The relative fungal DNA amount was quantified by means of qPCR. Six infected plants were randomly selected and collected for each condition assayed, and DNA obtained as previously described. For the detection and quantification of fungal DNA primers that generate fragments of the *EF1a* and *FTF2* (*Fusarium* Transcription Factor 2) genes were used (**Table 1**). Both genes are found as single-copy sequences in the genome of *F. oxysporum*. A fragment of the actin gene from common bean, generated by using primers Actin-F and Actin-R (**Table 1**), was used as an endogenous gene to normalize differences in DNA template amounts. The qPCR reaction components and cycling conditions were as above described, except that 1 ng of DNA was used as template.

Fungal biomass in inoculated samples was estimated as the relative quantity of FOP-SP1 or FOP-SP4 DNA normalized to an endogenous control of *P. vulgaris* DNA. Standard curves for *F. oxysporum* and *P. vulgaris* were constructed based on the relationship of Ct values and known host and pathogen DNA concentrations. Genomic DNA isolated from fungal mycelia grown in culture and samples of roots, root crowns, and hypocotyls of non-inoculated plants were used to create the standard curves. Each sample was evaluated in triplicate and the assay was repeated two times for each of the three biological replicates. The analyses were performed using StepOneTM Software V2.2.2.

Results

Cytological Characterization of Colonization by Weakly Virulent and Highly Virulent Strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Green fluorescent protein transformants of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* were generated by transformation of strains FOP-SP1 and FOP-SP4 with plasmid pRF-HU-GFP. Both strains are wild types isolated in El Barco de Ávila (Spain) that share IGS-A haplotype, mating type (MAT1-2) and race (6). However, FOP-SP1 is a HV strain that belongs to VCG 167, while FOP-SP4 belongs to

VCG 166 and behaves as WV when inoculated on common bean plants (Alves-Santos et al., 1999, 2002a). Several GFP expressing transformants were obtained for each strain and examined for mycelial growth, both in solid and liquid culture, sporulation and virulence. No significant differences could be observed in the rates of growth in PDA medium and rates of sporulation in PDB medium between the GFP transformants and their respective wild type strains. Infection assays were also performed to compare GFP expressing strains with the wild type strains by inoculation of cultivar Blanca Riñón, but no significant differences ($P > 0.9$ according to "Student's" t -test) could be observed when the mean disease symptoms or the disease progression rate (García-Sánchez et al., 2010) were assessed (data not shown).

To compare the patterns of common bean colonization by WV and HV strains three different regions of inoculated common bean plants were chosen for confocal microscopy based on the different architecture of their vascular system: the tap root, the root crown and the hypocotyl (Figure 1). The initial stages of root colonization were similar in plants inoculated with WV (FOP-SP4) and HV (FOP-SP1) strains. Following root dip inoculation, a dense web of hyphae grew over the surface of the taproot and the lateral roots (Figures 2G–L). Both strains showed a marked preference for the colonization of interstitial regions, especially the junctions of lateral roots with the tap root (Figures 2A–F) which appear to serve as preferred penetration areas. Specialized penetration structures could not be observed for any of the strains.

At 7 days post inoculation (dpi) the taproots were almost completely colonized by both strains. However, a clear distinction in the main distribution of the mycelium could be observed. The WV strain showed extensive intercellular growth in the root cortex, mainly along the longitudinal axis of the root (Figure 3B), although some hyphae could also be seen inside the xylem vessels of the central root cylinder. In contrast, the hyphae of the HV strain quickly reached the central root xylem where they spread along the xylem vessels (Figure 3A). Comparison of cross sections of the taproot clearly demonstrates how the WV strain behaves mainly as a root cortex colonizer (Figures 3E,F) while the HV strains behaves as a fast vascular colonizer (Figures 3C,D).

Fungal mycelia could also be seen in the root crown at 7 dpi. Two differences could be observed between the two strains. First, root crowns of plants inoculated with the HV strain had more green fluorescent hyphae than those inoculated with the WV strain (Figures 4A,B respectively). Second, the asymmetrical distribution of hyphae in xylem vessels and the intercellular spaces of cortex, observed in the taproot, was maintained. The colonization of the vascular system by the HV strain was preferentially observed in adjacent vessels, indicating that hyphae can penetrate the vessels (Figures 4C,E). Mycelium of the WV strain was mostly detected around the cells of the cortex, although some hyphae could also be seen growing inside the xylem vessels (Figures 4D,F). Plants inoculated with the HV strain were rated 1 and those inoculated with the WV strain were rated 0.

Early observations of plant hypocotyls (10 dpi) showed hyphae of the HV strain colonizing the inside of the xylem vessels

(Figure 5A) while the hyphae of the WV strain were preferentially seen along the walls of parenchymal cells in longitudinal sections (Figure 5B). Inoculated plants were rated 2 and 1, respectively. This observation and the difference in the ratings were confirmed in cross sections at 14 dpi (Figures 5C,E) when disease rates reached 3 for plants inoculated with the HV strain and 2 for plants inoculated with the WV strain. Although xylem vessels containing growing hyphae were observed for both strains (Figures 5D,F), the incidence (proportion of colonized vessels) was dramatically different, reaching 81.06% (± 8.88) for the HV strain and 11.39% (± 7.03) for the WV strain. Cross sections of plants 21 dpi showed massive amounts of hyphae of the HV strain growing almost exclusively inside the xylem vessels (Figures 5G,H), while most of the hyphae of the WV strain were around the parenchymal cells (Figures 5I,J). At this time, plants inoculated with the HV strain were almost dead and showed complete necrosis of the crown region and extensive necrosis of the xylem system of the hypocotyl (disease rate 4). Plants inoculated with the WV strain had some chlorosis, necrotic crown and some symptoms of necrosis in the xylem system of the hypocotyl (disease rate 3).

Quantification of Fungal Growth

In order to determine whether the patterns of colonization showed by both strains were correlated to differences in fungal biomass, the growth of both strains of the pathogen inside the plant was evaluated by means of a qPCR assay. *F. oxysporum* DNA relative to that of common bean was measured by assaying the *F. oxysporum* *EF1 α* and *FTF2* genes of FOP-SP1 and FOP-SP4 strains, and the *P. vulgaris actin* gene.

The accumulation of fungal biomass in the root system was similar in plants inoculated either with the HV strain or the WV strain, and reached a maximum at 3 dpi (Figure 6). In contrast, The accumulation of mycelium both in the root crown region and the hypocotyl was higher in plants inoculated with the HV strain than in plants inoculated with the WV strain: 16 times more in root crown at 7 dpi and more than five times in hypocotyl at 21 dpi (Figure 6).

Taking together the confocal microscopy observations and the qPCR fungal biomass quantification results, two main differences emerge in the colonization pattern of HV and WV strains. First, the HV strain is a specialized vascular colonizer, while the WV strain, although also able to colonize the vascular system, is better at colonizing cortex and parenchyma. Second, the HV strain accumulates a significantly higher amount of mycelium in plant aerial regions than the WV strain.

Expression Analysis of Selected Fungal Virulence Genes

In order to understand the genetic basis of the differential colonization patterns displayed by HV and WV strains, we analyzed the *in planta* changes of expression of a selected group of genes already shown to be involved in virulence or suspected to be virulence factors (Table 2). RNA samples were purified from root (1, 2 and 3 dpi), crown (5 and 7 dpi) and hypocotyl (14 and 21 dpi) and used in RT-qPCR experiments to measure the expression of each gene analyzed (Figure 7). The most relevant

changes of gene expression in root samples were the upregulation of *RHR1* and *EBR1* in both strains and the specific upregulation of *SGE1* (fivefold increase) and *FTF2* (threefold increase) in the WV strain. A drastic change in gene expression pattern related to the virulence of each strain was observed in crown at 5 dpi. With the exception of *SGE1* and *RHR2* all the genes analyzed showed upregulation (twofold or more) during the infection with the HV strain, reaching highest levels for *FTF1*, *SIX1*, and *RHR1* (more than fivefold increase). Two days later (7 dpi) the same plant region showed significant upregulation of *FNRI*, *PacC*, *FTF2* and *RHR1* in the WV strain. Relatively high expression patterns (threefold or more) in hypocotyl colonized by the WV strain remained for *RHR1* (14 and 21 dpi), *PacC* and *FTF2* (21 dpi), and in the case of hypocotyl colonized by the HV strain, for *PacC* (21 dpi), *FTF2* (14 and 21 dpi) and most significantly for *FTF1* (14 dpi) and *SIX1* and *RHR1* (14 and 21 dpi).

Significant differences in the gene expression patterns between both strains were observed for *FTF1*, *SIX1* and *SIX6*. The difference is obvious for *FTF1*, as it is specific to the HV strains, but both *SIX1* and *SIX6* are present in the genome of the WV strain although no expression could be detected at any stage of the infection process. Also, it is worth to note the upregulation of *SGE1* in root tissues colonized by the WV strain at 2 dpi, and the upregulation of *RHR1* in root crown and hypocotyl colonized by the HV strain at 5 and 21 dpi, respectively.

Expression Analysis of Selected Plant Defense Genes

We investigated the response of the pathogenesis related gene *PR1* and two ET responsive factors (*ERF1* and *ERF2*) in the plant tissues colonized either by the WV strain or the HV strain (Figure 8). Expression of *PR5* could not be detected in a consistent way and was discarded for further analysis. *PR1* showed an early downregulation in plant roots infected either by the WV strain or the HV strain, but 1 day later its expression was 50 times higher in roots infected by the WV strain than in roots infected by the HV strain. This difference was progressively attenuated and disappeared in infected root crown at 5 dpi. The expression of the *ERF1* gene was similar in plants infected either by the WV strain or the HV strain. Contrary to the *PR1* expression pattern, the induction of the *ERF1* gene reached a maximum in roots at 1 dpi and then slowly decreased. *ERF2* was also induced at early stages of infection but it was significantly overexpressed in roots infected by the HV strain. Therefore, two main findings must be highlighted. First, SAR response is repressed at the beginning of the infection while the ET-mediated response is activated in plants inoculated either with the HV or WV strains. Second, SAR response is delayed in plants infected by the HV strain with respect to those inoculated with the WV strain, while the ET responsive factor *ERF2* is significantly induced.

FTF1 Expression in *PTFT1::GFP* Transformants

The expression profile of the gene encoding the virulence factor *FTF1* above described is in contrast with former reports which

showed maximum expression in plant stem 24 h post inoculation (Ramos et al., 2007). In order to confirm our present observations, we obtained transformants of strain FOP-SP1 with a construct that included the *GFP* gene under the control of the *FTF1* promoter. The first observations of GFP-expressing mycelium in colonized plant tissues corresponded to the crown region at 7 dpi (Figure 9A) in accordance with a 10-fold overexpression of the gene. From this time GFP fluorescence was clearly visible inside the xylem vessels of hypocotyls at 10 dpi (Figure 9B) and 14 dpi (Figures 9C,D). Most of the xylem vessels in hypocotyls at 21 dpi were occluded by fungal mycelium (Figures 9E,F).

The expression pattern of *FTF1* in the confocal microscopy analysis matches the expression profile obtained in the RT-qPCR experiments, and confirms that upregulation of *FTF1* takes place in crown and hypocotyl from 7 dpi, under the present experimental conditions.

Discussion

The vast majority of microscopy analysis of plant colonization by *F. oxysporum* have been related to the details of particular interactions (Bishop and Cooper, 1983; Czymbek et al., 2007; Nahalkova et al., 2008; Li et al., 2011), or the differences in the colonization of susceptible and resistant cultivars (Bishop and Cooper, 1983; Zvirin et al., 2010; Jiménez-Fernández et al., 2013; Lü et al., 2013). Almost no attention has been paid to the study of differences in plant colonization based on the virulence of the infecting strains. Most likely this is because of the scarce availability of strains able to infect the same host while displaying a range of virulence, which to our knowledge has only been shown in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Alves-Santos et al., 2002a) and *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Gómez-Lama Cabanás et al., 2012).

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* strains may be classified as weakly and highly virulent against *P. vulgaris* (Alves-Santos et al., 2002a) or as weakly, highly and supervirulent against *P. coccineus* (de Vega-Bartol et al., 2011). In a former report (García-Sánchez et al., 2010) we described two main differences in the plant colonization pattern of a HV strain (FOP-SP2) and a WV strain (FOP-SP8), the latter being slower in the rate of xylem colonization and with a reduced capability to colonize xylem vessels. With the aim to gain deeper insight into host colonization features, we have analyzed two more strains (FOP-SP1 and FOP-SP4) and used a hydroponics system which allows for easier access to plant roots for sectioning and confocal microscopy visualization.

Penetration of host roots by *F. oxysporum* is assumed to occur by direct penetration or through wounds (Nelson, 1981). In the absence of wounds, most reports show that the preferred zone of ingress is the root apex (Sarrocco et al., 2007; Jiménez-Fernández et al., 2013) or root hairs (Lagopodi et al., 2002). We did not observe differences between the HV and the WV strains with regards to the ingress area. Both strains showed a preference for the junctions of the lateral roots with the taproot, where most likely they can take advantage of discontinuities in the plant

epidermis. The main difference observed at this stage between the HV and WV strains was the ability of the HV strain to reach the root vascular cylinder and quickly progress toward the root crown. The specialized dissemination of the HV strain inside the root is not related to a better growth rate as the total amount of fungal biomass in the root is very similar for both strains. The only differential expression detected in fungal genes corresponds to *SGE1* at 2 dpi and *RHR1* at 3 dpi, both upregulated in the WV strain. The genes whose expression is exclusive to the HV strain (*FTF1*, *SIX1* and *SIX6*) do not show significant upregulation in root, indicating that their induction is not required for penetration nor for the colonization of this part of the plant. The absence of significant expression of *FTF1* in roots is in agreement with previous reports (Ramos et al., 2007). In contrast with these results, some differences related to virulence are found in the expression of plant defense genes. *PR1* is significantly downregulated during the first 24 h of infection by the HV strain, while the opposite occurs in the common bean homologue of *ERF2*, one of the genes involved in the ET/JA defense response (Fujimoto et al., 2000). Ethylene and JA biosyntheses are activated by a variety of forms of stress, including the biotic stress induced by pathogens, and both pathways converge in the transcriptional activation of *ERF1* (Lorenzo et al., 2002) what makes it a good marker to detect the activation of both phytohormones. The homologue of *ERF1* in common bean is overexpressed in plants infected either with the WV strain or the HV strain at 1 dpi. It is worth to note that this induction of *ERF1* is accompanied by the already mentioned downregulation of *PR1*, which occurs not only in plants infected by the HV strain, but also when they are infected by the WV strain, although to a lesser extent. Diverse analysis have revealed that SA, ET and JA pathways influence the outcome of the disease produced by *F. oxysporum* in *Arabidopsis* (reviewed in Berrocal-Lobo and Molina, 2008). Our results indicate that higher *PR1* gene and lower *ERF* genes expression during the first 2 days of root infection correlate with a higher rate of parenchyma colonization and a lower rate of vascular cylinder colonization (infection with the WV strain), and vice versa (infection with the HV strain).

Vascular pathogens are characterized by their ability to colonize the vascular system of the host. The collapse of the xylem vessels, caused by the accumulation of fungal mycelium and host defensive molecules, produces a drastic reduction in the transport of water to the aerial parts of the plant and finally its death. The architecture of the stem vascular system develops in the crown area where the primordial ring of xylem vessels is formed. We observed in this area the most drastic differences, either in the amount of fungal biomass and its distribution, between the strains analyzed. Expression of several genes in both strains at this time point seems to be important to sustain crown colonization, namely *FTF2*, *FNRI*, *EBR1*, *PacC* and *RHR1*. The upregulation of *FTF2* actually begins in the root, in the case of the WV strain, and it is surprising as former analyses carried out by our group suggested this gene was not involved in host infection (unpublished results). *FTF2* and *EBR1* are members of different gene family expansions characteristic of *F. oxysporum*. Both genes appear as single copies in the genomes of several *Fusarium spp.*, but the

paralogues *EBR2*, *EBR3*, *EBR4* and the copies of *FTF1* are present only in *F. oxysporum* (de Vega-Bartol, unpublished; Jonkers et al., 2013). However, the relative importance of the paralogues and the single copy genes are different. *EBR1* is the most abundant transcript of the EBR family during host infection and its deletion results in a reduction of virulence, while the rest of the paralogues do not seem to have a role in host colonization (Jonkers et al., 2013). In the case of *FTF2*, the most abundant transcripts of the family during common bean infection are produced by the copies of *FTF1* and, although we have not yet analyzed a mutant deleted in *FTF2*, *FTF1* is exclusive to the HV strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

The upregulation of *FNRI* and *RHR1* seems to be related to the adaptation of fungal nutrition to a new compromising environment. *FNRI* has been described to mediate the adaptation to nitrogen-poor conditions *in planta* (Divon et al., 2006), such as those potentially found inside the xylem vessels. The *A. nidulans rhaR* gene encodes a transcription factor that positively regulates the expression of both the enzymes that liberate L-rhamnose from complex plant substrates (alpha-L-rhamnosidases) as well as those involved in the assimilation of this sugar, and hence confers *A. nidulans* the ability to adapt its metabolism to the availability of L-rhamnose (Tamayo-Ramos et al., 2012; Pardo and Orejas, 2014). Interestingly, RNA-seq data obtained from the *Aspergillus* Genome database (AspGD) suggest that *rhaR* could be preferentially expressed under nitrogen limiting conditions. Therefore, it is conceivable that once the mycelium of *F. oxysporum* grows inside the vascular system, where the preferred sugars are absent, it must obtain other carbon sources from the cell wall components of the lignified xylem vessels. There is a paralogue of *RHR1* in *F. oxysporum*, named *RHR2*, which does not show significant changes in expression during the colonization process, neither in the WV strain nor the HV strain.

PacC mediates regulation of gene expression by ambient pH in fungi (Peñalva et al., 2008). It has been shown in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* that *PacC* transcript levels rise when the fungus is grown in alkaline conditions (Caracuel et al., 2003). Here we show that *PacC* transcript levels increase at 7 dpi, in coincidence with the beginning of the colonization of the hypocotyl xylem vessels. This suggests that ambient pH inside the vessels is alkaline and that genes expressed under alkaline conditions are required for their colonization by either HV or WV strains.

The highest levels of gene expression were detected in the hypocotyl at 14 dpi and correspond to *FTF1*, which is unique to the HV strains, and the effector encoding genes *SIX1* and *SIX6*. At that time, observations of plants infected with the HV strain show that growth is restricted to the xylem vessels, thus indicating that *FTF1*, *SIX1* and *SIX6* are expressed during colonization of the vascular system. *SIX1* and *SIX6* are recognized as genuine effectors, as they contribute to the general virulence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Rep et al., 2004; Gawehns et al., 2014). Homologues of these genes have been found in other formae speciales like *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Niño-Sánchez, unpublished) and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (this work), although only the copies

present in the HV strain are expressed during infection. It cannot be ruled out that the *SIX1* and *SIX6* alleles in the genome of the WV strain are not functional. Alternatively, the expression of *SIX1* and *SIX6* might need a transcription activator not present in the WV strain, such as *FTF1*. The expression of *FTF1*, *SIX1* and *SIX6*, was detected at low levels in root 1 dpi, in accordance with the former results obtained for *SIX1* during tomato infection (van der Does et al., 2008). Upregulation of the three genes begins in the root crown 5 dpi, matching the accumulation of mycelium in this area and the beginning of massive colonization of xylem vessels.

The classical view of plant colonization by fungal vascular wilt pathogens assumes that, after penetration, the fungi colonize the cortical cells and then hyphae migrate intercellularly toward the vascular parenchyma cells and invade xylem vessels. Once the xylem is reached, the mycelium is mostly confined inside the vessels, until the necrosis of host tissues allows for general colonization (Yadeta and Thomma, 2013). In this work we have shown that a high level of virulence correlates with a high ability to quickly infect and colonize the plant vascular system, with almost no colonization of the root cortex, and that WV strains are efficient colonizers of host tissues before they become necrotized. Also, our data suggest a correlation between virulence and the expression of some components exclusive of the genome

of HV strains, such as the *FTF1* transcription factor, and other components that, although not exclusive, are only expressed in HV strains, such as the effectors *SIX1* and *SIX6*. *FTF1* paralogs are part of the unique sequences found in the genome of *F. oxysporum*, designated as lineage specific (Ma et al., 2010). It has been proposed that *F. oxysporum* lineage specific sequences located in dispensable chromosomes are the basis of host specialization and could explain the polyphyletic origins of most formae speciales (Ma et al., 2010). Our results show that they also contribute to explain *F. oxysporum* virulence.

Acknowledgments

This research was supported by grant AGL2012-39876-C02-01 from MINECO (Spain). JN-S and VC-dC are the recipients of fellowships AP2009-3559 and AP2010-2742, respectively, from MECO (Spain). VT held a postdoctoral position financed by grant AGL2012-39876-C02-01. We thank M. Orejas for valuable suggestions on the *RHR* genes, I. Martín for excellent advice on the preparation of plant samples for microscopic examination, R. Frandsen for advice on the use of the pRF-HU vectors, and S. Sukno for critical reading of the manuscript and many valuable suggestions.

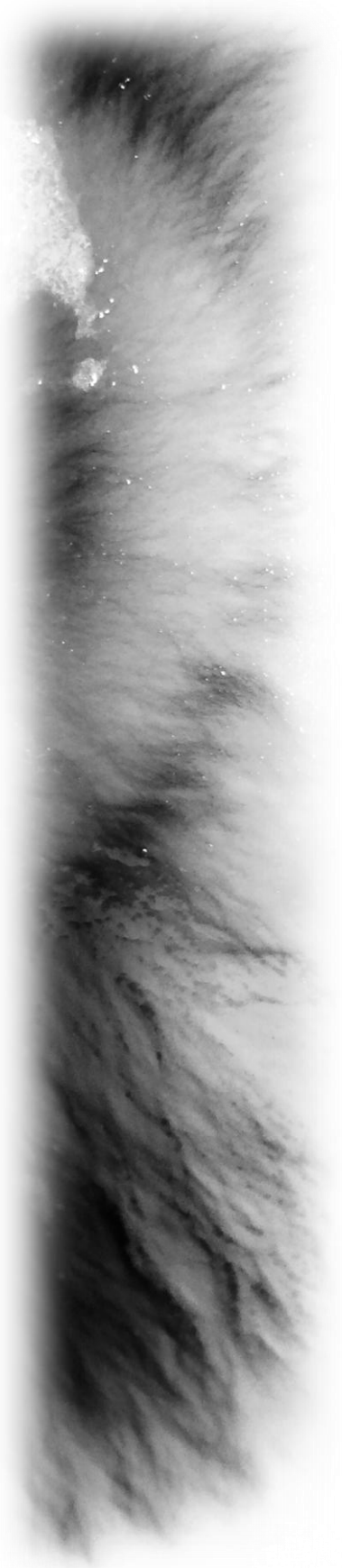
References

- Alves-Santos, F. A., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., et al. (2002a). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathol.* 51, 605–611. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x
- 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. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.3.237
- 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.
- Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. (1975). Reflections on the wilt fusaria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13, 95–103. doi: 10.1146/annurev.py.13.090175.000523
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2008). *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* 13, 145–150. doi: 10.1016/j.tplants.2007.12.004
- Bishop, C. D., and Cooper, R. M. (1983). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 15–27. doi: 10.1016/S0048-4059(83)81034-0
- Booth, C. (1971). *The Genus Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193. doi: 10.1677/jme.0.0250169
- Caracuel, Z., Roncero, M., Espeso, E., González-Verdejo, C., García-Maceira, F., and Di Pietro, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48, 765–779. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03465.x
- 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. doi: 10.1016/j.fgb.2007.01.012
- de Vega-Bartol, J. J., Martín-Domínguez, 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 fit1 correlates with virulence. *Phytopathology* 101, 470–479. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0252
- Divon, H. H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., and Fluhr, R. (2006). The global nitrogen regulator, FNRI, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 7, 485–497. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00354.x
- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- 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. doi: 10.1186/1471-2199-9-70
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12, 393–404. doi: 10.1105/tpc.12.3.393
- García-Sánchez, M., Martín-Rodrigues, 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. doi: 10.1016/j.fgb.2009.11.006
- Gawehns, F., Houterman, P. M., Ichou, F. A., Michielse, C. B., Hijdra, M., Cornelissen, B. J. C., et al. (2014). The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 336–348. doi: 10.1094/MPMI-11-13-0330-R
- Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., and Artés, E. (2012). Molecular analysis of Spanish populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* demonstrates a high genetic diversity and identifies virulence groups in races 1 and 2 of the pathogen. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 561–576. doi: 10.1007/s10658-011-9901-4
- Imazaki, L., Kurahashi, M., Lida, 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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05554.x

- Jiménez, T., Martín, I., Labrador, E., and Dopico, B. (2007). A chickpea Kunitz trypsin inhibitor is located in cell wall of elongating seedling organs and vascular tissue. *Planta* 226, 45–55. doi: 10.1007/s00425-006-0465-z
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0061360
- Jonkers, W., Xayamongkhon, H., Haas, M., Olivain, C., van der Does, H. C., Broz, K., et al. (2013). EBR1 genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environ. Microbiol.* 16, 1982–2003. doi: 10.1111/1462-2920.12331
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., Lugtenberg, B. J., et al. (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. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.2.172
- Li, C., Chen, S., Zuo, C., Sun, Q., Ye, Q., Yi, G., et al. (2011). The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 327–340. doi: 10.1007/s10658-011-9811-5
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., and Solano, R. (2002). ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165–178. doi: 10.1105/tpc.007468
- Lü, G., Guo, S., Zhang, H., Geng, L., Martyn, R. D., and Xu, Y. (2013). Colonization of *Fusarium* wilt-resistant and susceptible watermelon roots by a green-fluorescent-protein-tagged isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *J. Phytopathol.* 162, 228–237. doi: 10.1111/jph.12174
- Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464, 367–373. doi: 10.1038/nature08850
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B. A., and Sharon, A. (1998). Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* 102, 491–496. doi: 10.1017/S0953756297005789
- Michielse, C. B., and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10, 311–324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x
- Mullins, E., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D., and Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91, 173–180. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.2.173
- Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C., and Alabouvette, C. (2008). Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 286, 152–157. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01241.x
- Nelson, P. E. (1981). "Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*," in *Fungal wilt Diseases of Plants*, eds M. E. Mace, A. A. Bell, and C. H. Beckman (New York: Academic Press), 51–80.
- Nucci, M., and Anaissie, E. (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695–704. doi: 10.1128/CMR.00014-07
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P., Crous, P., Glenn, A., 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. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.006
- Pardo, E., and Orejas, M. (2014). The *Aspergillus nidulans* Zn(II)2Cys6 transcription factor AN5673/RhaR mediates L-rhamnose utilization and the production of alpha-L-rhamnosidases. *Microb. Cell Fact.* 13, 161.
- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H. N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16, 291–300. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.006
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martínez, Y., and Rickauer, M. (2010). A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 517–530. doi: 10.1007/s10658-009-9560-x
- Ramos, B. (2005). *Análisis de factores de patogenicidad y virulencia en el hongo Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. Ph.D. thesis, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
- 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. doi: 10.1016/j.fgb.2007.03.003
- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., et al. (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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Sarrocchio, 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.
- Sukno, S., García, V., Shaw, B., and Thon, M. (2008). Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 823–832. doi: 10.1128/AEM.01165-07
- Tamayo-Ramos, J. A., Flippin, M., Pardo, E., Manzanares, P., and Orejas, M. (2012). L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* alpha-L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microb. Cell Fact.* 11, 26. doi: 10.1186/1475-2859-11-26
- van der Does, H. C., Duyvesteyn, R. G. E., Goltstein, P. M., van Schie, C. C. N., Manders, E. M. M., Cornelissen, B. J. C., et al. (2008). Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1257–1264. doi: 10.1016/j.fgb.2008.06.002
- Yadeta, K. E., and Thomma, B. P. H. J. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4:97. doi: 10.3389/fpls.2013.00097
- Zhao, C., Waalwijk, W., de Wit, P. J., 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 Microb. Interact.* 24, 1407–1418. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0158
- Zvirin, T., Herman, R., Brotman, Y., Denisov, Y., Belausov, E., Freeman, S., et al. (2010). Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2. *Plant Pathol.* 59, 576–585. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02225.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Niño-Sánchez, Tello, Casado-del Castillo, Thon, Benito and Díaz-Mínguez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



-Resumen-

1. Objetivos de la investigación

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha comprobado que estirpes de la raza 6 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* manifiestan diferencias en la rapidez y gravedad de los síntomas en la colonización de la judía común *Phaseolus vulgaris* (Alves-Santos *et al.*, 2002a). Por tanto, atendiendo a su virulencia, estas estirpes se han clasificado en tres grupos: poco virulentas, muy virulentas y súper virulentas (de Vega-Bartol *et al.*, 2011).

Los objetivos de este trabajo son, por una parte, conocer las diferencias existentes en la dinámica de colonización entre estirpes poco virulentas y muy virulentas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*; y por otra, conocer el patrón transcriptómico diferencial implicado en la virulencia entre ambos grupos, así como conocer las vías de respuesta defensiva inducidas por *F. oxysporum* en *P. vulgaris*.

2. Metodología

Para poder llevar a cabo los objetivos de este estudio se recurrió a los siguientes métodos:

- **Microscopía láser confocal.** Utilizada para visualizar y cuantificar mediante análisis de imágenes la dinámica de colonización de las diferentes estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* marcadas con la proteína fluorescente GFP. Este método también se utilizó para conocer el patrón de expresión de *FTF1* al marcar la estirpe muy virulenta FOP-SP1 con GFP inducible por el promotor de *FTF1*.

- **PCR a tiempo real.** Utilizada para conocer el patrón de expresión de genes implicados en la virulencia durante la colonización de *P. vulgaris*, así como el de genes marcadores de distintas vías de defensa en la planta. Además, fue un método complementario en el estudio de la dinámica de colonización, al poder conocer de manera cuantitativa y puntual la biomasa de *F. oxysporum* alojada en la planta.

3. Resultados

Análisis microscópico de colonización

El análisis microscópico de la superficie del sistema radicular no mostró diferencias durante los primeros estadios en la colonización de las raíces por las estirpes poco y muy virulenta. Tampoco fueron observadas estructuras de penetración en ninguna de las dos estirpes, pero sí se encontraron grandes acúmulos de micelio en la superficie de las raíces laterales desde el segundo día después de la inoculación. Estos acúmulos estaban presentes preferentemente en las regiones intersticiales, en especial en las uniones de las raíces laterales con la raíz principal; lo que indica que las hifas entran directamente entre las células epiteliales, ya sea mediante herida o mediante zonas de discontinuidad epitelial, como ocurre en el caso mencionado.

Tras una semana de infección, la raíz principal se mostraba completamente colonizada por ambas estirpes, aunque con una clara diferencia en cuanto a la distribución de micelio. La estirpe poco virulenta SP4GFP mostró un crecimiento en buena parte restringido, pero no limitado, al parénquima cortical, con gran crecimiento intercelular a lo largo de toda la longitud de la raíz. Este hecho contrasta con la colonización observada en el caso de la estirpe muy virulenta SP1GFP. Las hifas de esta estirpe superan la endodermis, alcanzando rápidamente el cilindro central de la raíz, donde se propagan por los vasos del xilema, llegando a zonas superiores de la planta.

La rapidez en la colonización de las zonas aéreas de la planta se corrobora mediante la visualización de acumulación de micelio a la semana de la inoculación en el cuello de raíz por la estirpe muy virulenta, mientras que este hecho no se observa en la estirpe poco virulenta. Este dato visual coincide con la medida de la biomasa de *F. oxysporum in planta*, que señala una diferencia notable entre las dos estirpes en la zona aérea de la planta. En estos estadios la estirpe muy virulenta FOP-SP1 acumula más micelio que la poco virulenta FOP-SP4, llegando a ser de 16 veces más en el cuello de raíz tras la primera semana de infección.

La comparación en las secciones transversales de ambos procesos de infección demuestra cómo SP4GFP es un gran colonizador del parénquima cortical, mientras que

SP1GFP se muestra como un efectivo y alérgico colonizador de los haces vasculares. Esta disposición es similar a la observada en el cuello de raíz e hipocotilo, hecho verificado cuantitativamente mediante el análisis de imágenes de secciones transversales, que mostraron que el 81,06% del micelio de la estirpe muy virulenta se encuentra en los haces vasculares, mientras que la proporción en la estirpe poco virulenta fue del 11,39%.

Análisis de expresión de genes relacionados con virulencia en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Los patrones de expresión de una batería de genes descritos previamente como implicados en la virulencia en *F. oxysporum* (Michielse y Rep, 2009) fueron analizados durante el proceso de infección de *P. vulgaris* por ambas estirpes.

Las diferencias más claras en los patrones de expresión entre la estirpe muy virulenta FOP-SP1 y la poco virulenta FOP-SP4 fueron las relativas a los genes *FTF1*, *SIX1* y *SIX6*. *FTF1* es un gen presente exclusivamente en las estirpes muy virulentas y súper virulentas de *F. oxysporum* (de Vega-Bartol *et al.*, 2011), por lo que dicha diferencia en su perfil transcriptómico resulta obvia. *FTF1* comparte con los genes codificadores de los efectores *SIX1* y *SIX6* un patrón de expresión semejante. La expresión de estos genes comienza en el cuello de raíz tras 5-7 días de la inoculación, y muestran un pico de expresión en el hipocotilo tras 14 días. Al igual que en el caso de *FTF1*, no se encontró expresión de los genes *SIX1* y *SIX6* en la estirpe poco virulenta.

Es preciso destacar que los genes *SGE1*, regulador de genes efectores, y *RHR1*, regulador de la expresión de ramnosidasas, mostraron una inducción notable durante el proceso de infección en ambas estirpes.

Asimismo, la expresión del gen *FTF1* durante el proceso de infección fue analizada mediante microscopía láser confocal. Para ello se analizaron transformantes marcados con el gen de la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor de *FTF1* correspondiente a la copia homóloga de *FOXG_14257* en la estirpe FOP-SP1.

Los análisis microscópicos mostraron que el micelio alojado en los haces xilemáticos de la planta expresaban el gen *GFP* desde el séptimo día tras la

inoculación. Esto demuestra la funcionalidad de la copia homóloga de FOXG_14257 en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, cuyo patrón de expresión inferido por la expresión del gen *GFP* coincide con los datos de expresión obtenidos mediante PCR cuantitativa, confirmando que la inducción de *FTF1* ocurre desde el séptimo día después de la inoculación en los haces xilemáticos del cuello de raíz e hipocotilo.

Análisis de expresión de genes relacionados con la defensa de la planta

Se analizó la expresión de genes marcadores de la vía de señalización dependiente del ácido salicílico (*PR1* y *PR5*) y genes marcadores de la vía de señalización dependiente de etileno y ácido jasmónico (*ERF1* y *ERF2*) durante el proceso de infección por las estirpes poco virulenta y muy virulenta.

La expresión de *PR5* no fue detectada en ninguna de los casos, pero sí se obtuvo el patrón de expresión de *PR1* que indicó que la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), dependiente de ácido salicílico, se activa en *P. vulgaris* en respuesta a la interacción con *F. oxysporum* y, de forma más temprana y aguda, en la infección por la estirpe poco virulenta.

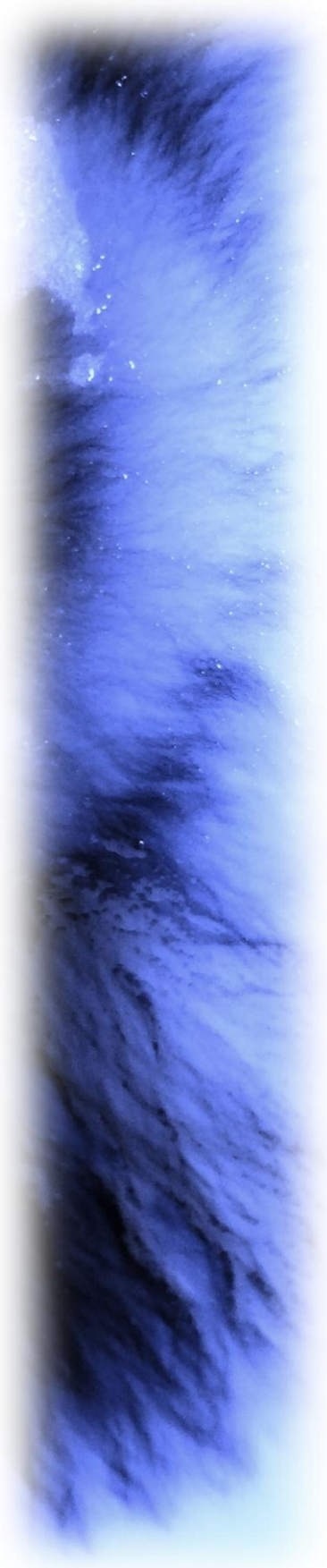
Los análisis mediante PCR a tiempo real también mostraron la activación de la vía de señalización dependiente de etileno y jasmonato, responsable de la activación de respuesta a patógenos. La inducción de estos genes, a diferencia de los genes *PR*, se observó únicamente en los primeros estadios de la infección, siendo mayor en la infección por la estirpe muy virulenta.

5. Conclusiones finales

1. Existen diferencias notables entre las estirpes poco virulentas y muy virulentas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en la colonización del hospedador *Phaseolus vulgaris* L. La estirpe muy virulenta FOP-SP1 avanza hacia el cilindro vascular de la raíz principal más rápido que la estirpe poco virulenta FOP-SP4, lo que permite una diseminación más rápida por el sistema vascular de la planta infectada. Además, FOP-SP1 crece de manera masiva dentro de los haces xilemáticos, mientras que FOP-SP4 tiene un crecimiento en los mismos proporcionalmente menor al mostrado en el tejido parenquimático.

2. Las diferencias en la colonización se corresponden con un patrón de expresión específico de algunos de los factores de virulencia de hongos exclusivos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1, como *FTF1*, *SIX1* y *SIX6*.

3. La respuesta de defensa de *P. vulgaris* depende del grado de virulencia de la estirpe de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con que es infectada. La respuesta sistémica adquirida (SAR) mediada por ácido salicílico es más temprana e intensa en la respuesta a la estirpe poco virulenta FOP-SP4 que hacia la estirpe muy virulenta FOP-SP1. En ambas interacciones la respuesta mediada por etileno y jasmonato es activada al comienzo de la infección.



*-Segunda
publicación-*

1 The *FTF* gene family regulates virulence and expression of *SIX* 2 effectors in *Fusarium oxysporum*

AQ19 3 JONATHAN NIÑO-SÁNCHEZ¹, VIRGINIA CASADO-DEL CASTILLO¹, VEGA TELLO¹,
4 JOSÉ J. DE VEGA-BARTOL², BRISA RAMOS³, SERENELLA A. SUKNO¹ AND
5 JOSÉ MARÍA DÍAZ MÍNGUEZ¹, *

6 ¹Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (Ciale), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, C/Río Duero 12, Villamayor
7 37185, Salamanca, Spain

8 ²Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica/Instituto de Tecnologia Química e Biológica-Universidade Nova de Lisboa (IBET/ITQB-UNL), Av. República 2784-
9 505, Oeiras, Portugal

10 ³Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid-INIA, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón 28223, Madrid,
11 Spain

12

13

14 SUMMARY

15 The *FTF* (*Fusarium transcription factor*) gene family comprises a
16 single copy gene, *FTF2*, which is present in all the filamentous
17 ascomycetes analysed, and several copies of a close relative,
18 *FTF1*, which is exclusive to *Fusarium oxysporum*. An RNA-
19 mediated gene silencing system was developed to target mRNA
20 produced by all the *FTF* genes, and tested in two formae spe-
21 ciales: *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (whose host is common
22 bean) and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (whose host is tomato).
23 Quantification of the mRNA levels showed knockdown of *FTF1*
24 and *FTF2* in randomly isolated transformants of both formae spe-
25 ciales. The attenuation of *FTF* expression resulted in a marked
26 reduction in virulence, a reduced expression of several *SIX*
27 (*Secreted In Xylem*) genes, the best studied family of effectors in
28 *F. oxysporum*, and lower levels of *SGE1* (*Six Gene Expression 1*)
29 mRNA, the presumptive regulator of *SIX* expression. Moreover,
30 the knockdown mutants showed a pattern of colonization of the
31 host plant similar to that displayed by strains devoid of *FTF1* cop-
32 ies (weakly virulent strains). Gene knockout of *FTF2* also resulted
33 in a reduction in virulence, but to a lesser extent. These results
34 demonstrate the role of *FTF* gene expansion, mostly the *FTF1*
35 paralogues, as a regulator of virulence in *F. oxysporum* and sug-
36 gest that the control of effector expression is the mechanism
37 involved.

38

39 **Keywords:** effector, *FTF*, Fusarium wilt, genomic expansion,
40 pathogenicity, transcription factor, virulence.

41

42

43 INTRODUCTION

44 *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. is an anamorphic species
45 complex (*Fusarium oxysporum* species complex, FOSC) ubiquitous

*Correspondence: Email: josediaz@usal.es

46 in soils worldwide and able to grow as a saprophyte or by the col- 46
47 onization of plants. The pathogenic strains collectively may infect 47
48 more than 100 different hosts, many of them important crops 48
49 (Michielse and Rep, 2009), but the individual isolates are able to 49
50 infect only one or a few plant species, allowing for classification 50
51 into host-specific forms, known as formae speciales (Armstrong 51
52 and Armstrong, 1981). The comparison between the genomes of 52
53 the different *F. oxysporum* formae speciales sequenced to date 53
54 and those of the two other species of the *Fusarium* genus, 54
55 *F. graminearum* and *F. verticillioides*, has revealed a well- 55
56 conserved core genome in the three species and several lineage- 56
57 specific (LS) genomic regions in *F. oxysporum* (Ma *et al.*, 2010). LS 57
58 regions are mostly organized into supernumerary chromosomes, 58
59 which contain genes that are not required for basic metabolic 59
60 processes and are absent in closely related species. The LS regions 60
61 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* include four entire chromosomes 61
62 (chromosomes 3, 6, 14 and 15), parts of chromosome 1 and 2, 62
63 and some small scaffolds. It has been shown that the transfer of 63
64 some LS chromosomes between strains of *F. oxysporum* may con- 64
65 vert a non-pathogenic strain into a pathogen, thus demonstrating 65
66 the importance of the LS part of the genome in pathogenicity. 66
67 These regions show a surprising enrichment of transposable ele- 67
68 ments and genes predicted to encode secreted proteins, some 68
69 specifically expressed during plant infection, such as the *SIX* 69
70 (*Secreted In Xylem*) genes (Houterman *et al.*, 2008; Rep *et al.*, 70
71 2004).

72 Among the gene families expanded in the LS genome of 72
73 *F. oxysporum*, it is worthwhile to highlight *FTF1* (*Fusarium tran-* 73
74 *scription factor 1*). This gene putatively encodes a Zn(II)₂Cys₆ 74
75 transcription factor and was first described in highly virulent (HV) 75
76 strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Ramos *et al.*, 2007) as part 76
77 of a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) designed 77
78 for *in planta* detection (Alves-Santos *et al.*, 2002b). mRNA tran- 78
79 scribed from the multiple copies of *FTF1*, or at least some of 79
80 them, is abundant in plants colonized by *F. oxysporum*, but barely 80
81 detectable in cultures of the fungus (Ramos *et al.*, 2007). The 81

82 expression level of the gene correlates with the number of copies
 83 in strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and the degree of viru-
 84 lence displayed by these strains when colonizing *Phaseolus vulga-*
 85 *ris* L. and *Phaseolus coccineus* L. plants (Alves-Santos *et al.*,
 86 2002b; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Eleven homologues of the
 87 gene have been detected in the genome of the tomato pathogen
 88 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain 4287 (de Vega-Bartol *et al.*,
 89 2011). Three of these copies (FOXG_16414, FOXG_14257 and
 90 FOXG_17458) are located in chromosome 14 close to mini-
 91 clusters of *SIX* effector-encoding genes (Schmidt *et al.*, 2013).
 92 Recently, it has been shown that *FTF1* is highly expressed in root
 93 crown and hypocotyl of common bean plants inoculated with an
 94 HV strain of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Niño-Sánchez *et al.*,
 95 2015). Furthermore, up-regulation of *FTF1* correlates with the
 96 highest level of expression of the effector-encoding genes *SIX1*
 97 and *SIX6*, which takes place when fungal growth is restricted to
 98 the vascular system (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Another gene
 99 expansion in *F. oxysporum*, *EBR1* (*Enhanced Branching 1*), has
 100 been shown to be involved in virulence, similar to its counterpart
 101 in *F. graminearum* (Jonkers *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2011). *EBR1*
 102 is located in chromosome 7 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and
 103 thus is part of the core genome, whereas the other EBR
 104 paralogues are located in LS chromosomes. Mutants altered in
 105 *EBR1* showed reduced growth when grown in culture and reduced
 106 virulence against tomato plants (Jonkers *et al.*, 2013).

107 In this work, we addressed the structure of the *FTF* gene family
 108 of *F. oxysporum*, and focused on the functional role of the *FTF1*
 109 paralogues by reducing their expression through gene silencing.

110 RESULTS

111 *FTF2* is a single copy gene with similarity to *FTF1*

112 Early studies on *FTF1* showed that HV (when inoculated in com-
 113 mon bean plants) and supervirulent (SV, when inoculated in run-
 114 ner bean plants) isolates of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*
 115 harboured four and five copies of this gene, respectively (Ramos
 116 *et al.*, 2007; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). However, a faint hybrid-
 117 ization signal could also be detected in digested DNA of these
 118 strains, non-pathogenic and weakly virulent (WV, when inoculated
 119 in common bean plants) strains (Fig. 1), suggesting that all of
 120 these strains harbour a second gene able to cross-hybridize with
 121 *FTF1*. We identified two recombinant phages when a genomic
 122 library from the WV strain FOP-SP4 was hybridized with a probe
 123 containing part of the *FTF1* promoter and the beginning of the
 124 open reading frame (ORF). DNA from both phages was subcloned
 125 into pBluescript KS+ and the *FTF1* hybridizing region contained in
 126 both was sequenced. The coding region of the gene detected in
 127 the cloned DNA fragment comprises 3219 bp interrupted by a 49-
 128 bp intron located in the same position as that of the intron found
 129 in *FTF1*. The predicted polypeptide is 1072 amino acids in length

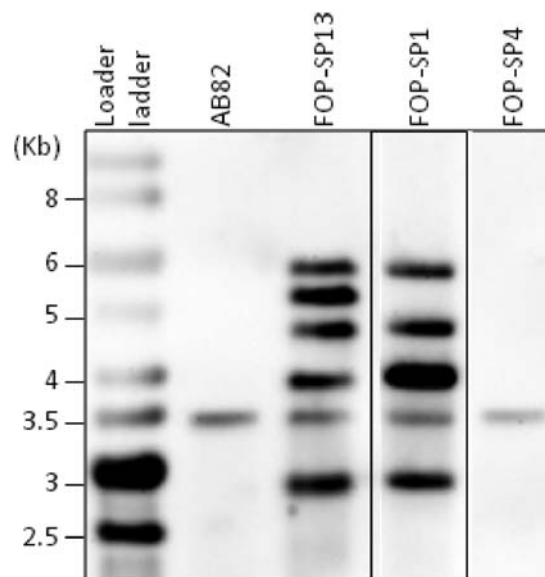


Fig. 1 Southern hybridization of *Hind*III-digested DNA from different strains of *Fusarium oxysporum*. The membrane was hybridized with the probe M18B-M19A which is a segment of the central coding region of the *FTF1* (*Fusarium transcription factor 1*) gene. Size markers are indicated on the left. AB82 is a non-pathogenic strain, FOP-SP13 is a supervirulent (SV) strain, FOP-SP1 is a highly virulent (HV) strain and FOP-SP4 is a weakly virulent (WV) strain.

and contains the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA-binding motif 130
 and a 'fungal-specific transcription factor domain' or 'medium 131
 homology region' (MHR) (Schjerling and Holmberg, 1996). 132

133 Hybridization of several probes derived from the *FTF2* coding
 134 region to digested genomic DNA from several *F. oxysporum*
 135 strains (non-pathogenic, WV, HV and SV) showed a single hybrid-
 136 izing fragment in non-pathogenic and WV strains, and several
 137 fragments corresponding to the *FTF2* gene and the known copies
 138 of the *FTF1* gene in the HV and SV strains (data not shown).
 139 Sequencing of the DNA insert cloned in one of the recombinant
 140 phages revealed an ORF corresponding to a homologue of the
 141 *BimB* gene of *Aspergillus nidulans* (May *et al.*, 1992) 5 kb
 142 upstream of *FTF2*. Hybridization of the above-described genomic
 143 DNA with a probe derived from the *F. oxysporum* *BimB* homo-
 144 logue revealed a single hybridizing fragment of the same size in
 145 all the strains analysed (data not shown), indicating that *FTF2* is a
 146 single copy gene with a genomic location different from that of
 147 the *FTF1* copies. Further confirmation of the single copy nature of
 148 *FTF2* was obtained when promoter and ORF fragments of *FTF2*
 149 were PCR amplified from a set of HV, WV and non-pathogenic
 150 strains. Sequencing of the amplicons revealed that the fragments
 151 were 100% identical.

152 A BLAST analysis of the 12 available sequenced genomes in
 153 FOSC yielded a unique *FTF2* homologue in all isolates (Table 1).
 154 All the putative proteins identified as *FTF2* transcription factors

Table 1 *FTF1* (*Fusarium transcription factor 1*) and *FTF2* (*Fusarium transcription factor 2*) copies in *Fusarium oxysporum* formae speciales.

Formae speciales	<i>FTF2</i>	<i>FTF1a</i>	<i>FTF1b</i>	<i>FTF1c</i>	Truncated
<i>Pisi</i>	FOVG_10613				FOVG_18329
Fo 47	FOZG_12687				FOZG_18011 (1007)
Fo human	FOYG_11202				
<i>radicis-lycopersici</i>	FOCG_10914				FOXG_17757 (446)
<i>lycopersici</i> r. 2	FOXG_09390 Chr 9, Sc 11	FOXG_14257 (1070)* Chr 14, Sc 22 FOXG_17458 (1079) Chr 14, Sc 51 FOXG_14422 (1072)* Chr. 15, Sc 24 FOXG_15059 (1072)* Chr 1, Sc 27		FOXG_17123 (930) Chr 6, Sc 22 FOXG_16414 (930) Chr 14, Sc 36 FOXG_14000 (930) [†] Chr 6, Sc 21 FOXG_17084 (930) [†] Chr 6, Sc 41 FOXG_12539 (930) [†] Chr 3, Sc 18 FOXG_12589 (930) [†] Chr 3, Sc 18	
<i>lycopersici</i> r. 3	FOWG_05099	FOWG_17325 (1070) FOWG_18009 (1079)		FOWG_17814 (930) FOWG_17908 (930) FOWG_17740 (930)	
<i>raphani</i>	FOQG_03479	FOQG_15325 (1071)			FOQG_19052 (914)
<i>cubense</i>	FOIG_05174	FOIG_16560 (1046)	FOIG_16484 (971) FOIG_16630 (969)		
<i>vasinfectum</i>	FOTG_03936	FOTG_16755 (1072) FOTG_17879 (1072) FOTG_18080 (1098)	FOTG_17956 (969)		FOTG_18226 FOTG_18225
<i>arabidopsis</i>	FOXB_12381				FOXB_19743 FOXB_12596 FOXB_18246
<i>melonis</i>	FOMG_08221	FOMG_18985 (1075)	FOMG_18692 (969)	FOMG_18999 (930)	FOMG_18691 FOMG_19647
<i>conglutinans</i>	FOPG_02091				FOPG_19962 FOPG_18130 FOPG_19108
<i>phaseol</i> [§]	JN167165	phasl14257 phasl17458 phasl15059			

*,+Identical copies.

[†]These copies have an exclusive stretch of amino acids between positions 7 and 17.

[§]Sequenced paralogues, one more *FTF1* paralogue has been detected by Southern hybridization; phasl followed by a locus number indicates the homologous locus in the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* genome.

155 showed similarities higher than 99.7% (in some cases they were
156 identical), indicating that *FTF2* is a unique locus in FOSC.

157 *FTF* gene expansion

158 The use of an *FTF2* sequence, or the previously described *FTF1*
159 sequence, in BLAST analysis of the available genomes of FOSC,
160 yields, in addition to the *FTF2* locus, a number of copies that
161 show a variable degree of similarity and that we collectively
162 denominate as *FTF1* (Table 1). The number of *FTF1* copies or
163 paralogues found in each strain is variable, ranging from none in
164 the *pisi*, biocontrol, human, *radicis-lycopersici*, *arabidopsis* and
165 *conglutinans* isolates, to 10 in the *lycopersici* race 2 strain (4287).
166 However, the number found in strain 4287 should be approached

with caution, as loci FOXG_14422 and FOXG_15059, and loci 167
FOXG_14000, FOXG_17084, FOXG_12539 and FOXG_12589, are 168
identical duplicates. It is worthwhile to highlight that all the cop- 169
ies of *FTF1* in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 map to chromo- 170
somes 3, 6, 14 and 15 and scaffold 27 (chromosome 1), which are 171
LS regions in this strain (Ma *et al.*, 2010), whereas *FTF2* is located 172
in the core genome (chromosome 9). The analysis of homologies, 173
at both the nucleotide and amino acid levels, between *FTF2* and 174
all the *FTF1* loci in the different formae speciales shows that *FTF2* 175
is more distinct to *FTF1* than the *FTF1* copies are among them 176
(Figs 2A,C, S1A, see Supporting Information). 177

The analysis of the proteins putatively encoded by the different 178
FTF1 loci shows a range of variation in length, in contrast with the 179
homogeneity of *FTF2*, which allows for the classification of three 180

AQ2
F2

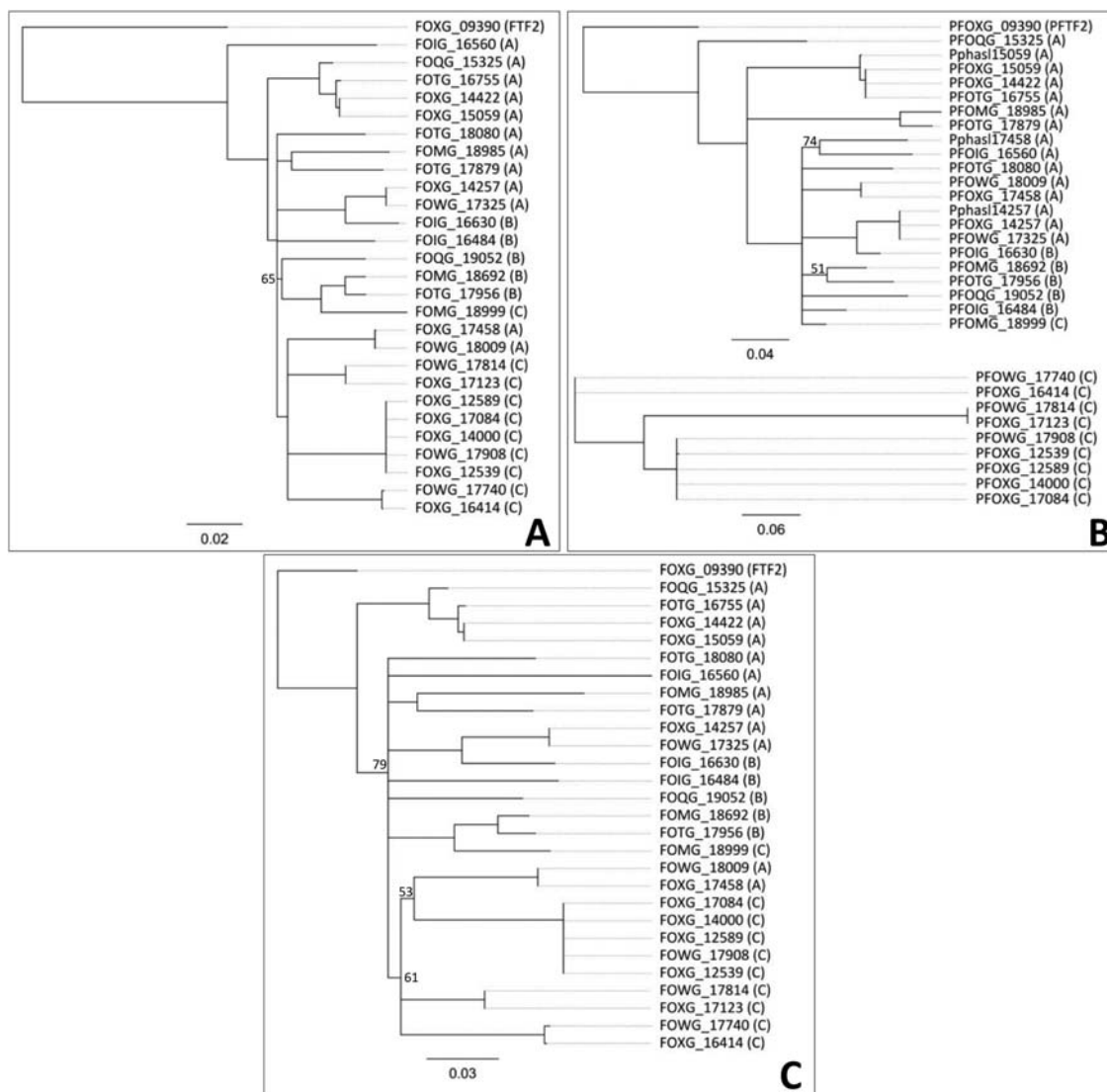


Fig. 2 Similarity between the *FTF2* (*Fusarium transcription factor 2*) and *FTF1* (*Fusarium transcription factor 1*) paralogs, and the deduced proteins, found in the *Fusarium oxysporum* genomes of the different formae speciales. (A) Dendrogram obtained using the alignment of the open reading frames (ORFs). (B) Dendrogram obtained using the alignment of the promoter region (0.5 kb). (C) Dendrogram obtained using the alignment of the deduced proteins. FOXG loci correspond to the *f. p. lycopersici* race 2 isolate (4287), FOIG loci correspond to the *f. sp. cubense* isolate, FOQG loci correspond to the *f. sp. raphani* isolate, FOTG loci correspond to the *f. sp. vasinfectum* isolate, FOMG loci correspond to the *f. sp. melonis* isolate and FOWG loci correspond to the *f. sp. lycopersici* race 3 isolate (see Table 1 for a description of the different loci). The scale indicates the length of branch that represents one substitution per site. Numbers on the branches are bootstrap support values below 80.

181 basic types (Table 1). The FTF1a type is 1070–1079 amino acids in
 182 length in most cases, similar to the FTF2 deduced protein, and can
 183 be found in most formae speciales, including three of the *phaseoli*
 184 paralogues. The FTF1b type is 969–971 amino acids in length and
 185 shows a shorter carboxy-terminus than FTF1a. Paralogues encod-
 186 ing FTF1b are found in the *cubense*, *vasinfectum* and *melonis* iso-
 187 lates. Finally, the FTF1c type of putative protein is 930 amino
 188 acids in length, with shorter amino- and carboxy-termini, and is
 189 exclusive to *f. sp. lycopersici*.

Apart from these well-defined loci, several truncated copies of
FTF1 are found in most isolates (see Table 1). The alterations
 shown by these copies range from small internal deletions or a
 premature stop codon, as in the *raphani* and biocontrol isolates,
 respectively, to large deletions in the amino- or carboxy-terminus,
 or the central region of the proteins, which most probably pre-
 clude a normal function for these putative proteins.

Former expression analysis has suggested that *FTF2* and *FTF1*
 respond to different regulatory signals *in planta* (Niño-Sánchez

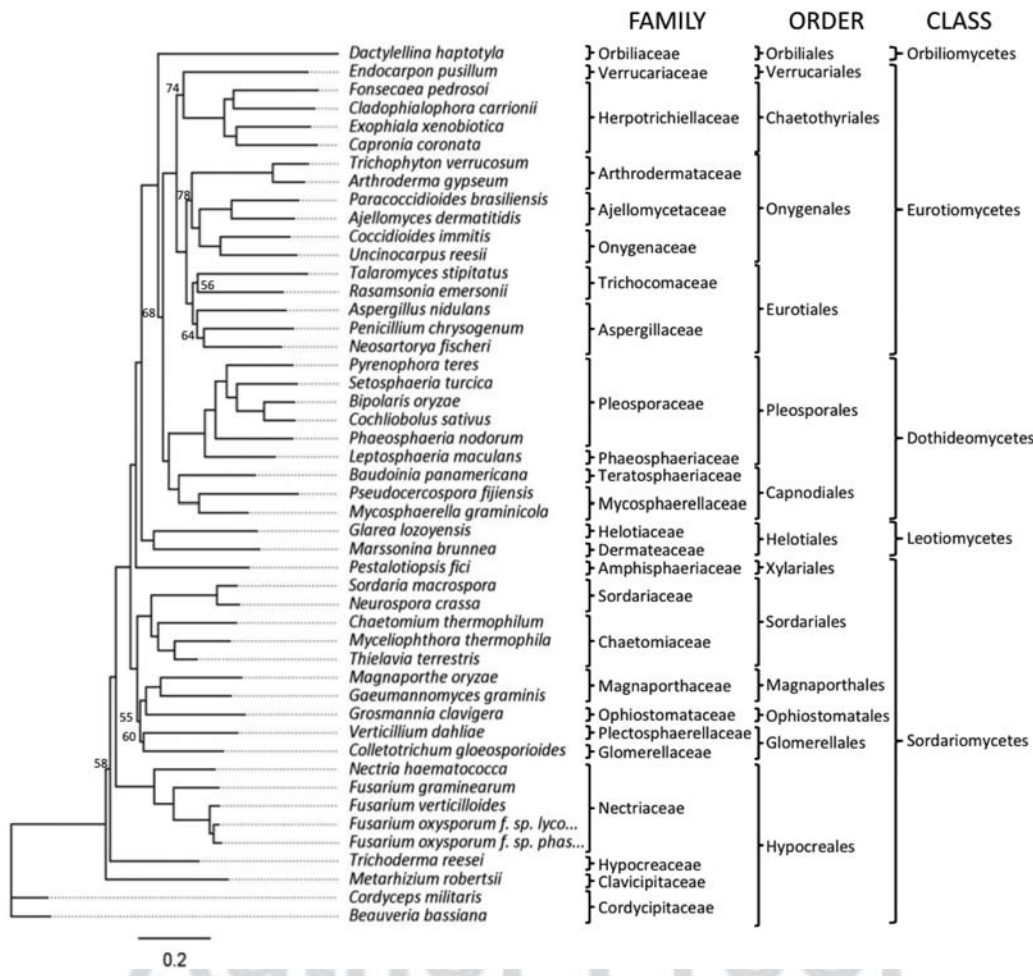


Fig. 3 Genetic similarity between the *FTF2* (*Fusarium transcription factor 2*) homologues in different fungal species. The dendrogram was obtained using the open reading frames (ORFs) of the unique *FTF2* sequences found in the corresponding fungal genomes, except for the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *phaseoli* ORFs, where FOXG_09390 and GenBank JN167165 were used, respectively. The scale indicates the length of branch that represents one substitution per site. On the right, the names of the species, family, order and class are shown. Numbers on the branches are bootstrap support values below 80.

199 *et al.*, 2015). In addition, *FTF2* shows a steady low level of tran-
 200 scription accumulation during growth in culture, with no significant
 201 differences among strains based on virulence (Fig. S2, see Sup-
 202 porting Information). To gain an insight into the regulation of
 203 *FTF1* and *FTF2*, we compared a 500-bp promoter stretch immedi-
 204 ately upstream of the ATG codon (selected as the codon encoding
 205 the methionine of the MSG amino acid sequence). The dendro-
 206 gram in Fig. 2B shows two distinct groups. The promoters of cop-
 207 ies *FTF1a* and *FTF1b* show a clustering pattern similar to that
 208 obtained when comparing the ORFs (Fig. 2A). The promoters of
 209 the *FTF1c* copies cannot be aligned with the promoters of *FTF1a*
 210 and *FTF1b*, except for FOMG_18999, and therefore they cluster in
 211 a different group. It is worthwhile to note that the only *FTF1* pro-
 212 moter whose functionality has been demonstrated is *Pphas1/14257*
 213 in FOP-SP1 (Niño-Sánchez *et al.*, 2015), which is homologous to
 214 the promoter found in the FOXG_14257 copy of strain 4287.

To verify whether the *FTF* gene family is present in other fungi,
 215 BLAST searches using the *FTF1* and *FTF2* ORFs, or the deduced poly-
 216 peptides, as query sequences, were performed against other fun-
 217 gal genomes. A single copy gene homologous to *FTF2* was found
 218 in the genomes of all the filamentous ascomycetes of the subphylum
 219 Pezizomycotina (Euascomycota) tested, but absent in the
 220 genomes of yeasts, basidiomycetes, zygomycetes and chytridiomy-
 221 cetes (Fig. 3). This result indicates that *FTF2* is a single copy gene
 222 F3 specific to filamentous fungi, whereas the *FTF1* paralogues and
 223 the genomic expansion are exclusive to FOSC.
 224

Analysis of mutants of the *FTF* genes

225
 226 The relationship between the number of copies of *FTF1* and viru-
 227 lence has been well determined in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*
 228 (Alves-Santos *et al.*, 2002a, b; de Vega-Bartol *et al.*, 2011) and

AQ3 229 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Gómez-Lama Cabanás, personal com- 279
 230 munication). However, the large number of copies found makes 280
 231 the construction of knockout mutants an insurmountable task. 281
 232 The high similarity between *FTF2* and *FTF1* and among the copies 282
 233 of *FTF1* makes this expansion an attractive target for gene silenc- 283
 234 ing based on RNA interference (RNAi) methodology (Fig. S1B). 284
 235 However, the attenuation of gene expression obtained in this way 285
 236 affects *FTF2* and the copies of *FTF1*. To discriminate the contribu- 286
 237 tion of each gene to the virulence phenotype, we first generated 287
 238 null mutants of *FTF2* in the FOP-SP1 strain. As the genome anno- 288
 239 tation shows that there is an ORF (FOXG_09391) located contigu- 289
 240 ous to the 3' end of the coding region of *FTF2*, a deletion 290
 241 construct was generated using the 5' end flanking region of *FTF2* 291
 242 (which is specific to *FTF2*) and the 3' terminus of the *FTF2* coding 292
 243 region (which is highly similar between *FTF2* and *FTF1* copies). 293
 244 This strategy was designed to optimize the probabilities of delet- 294
 245 ing most of the *FTF2* coding region without deleting a *FTF1* 295
 246 paralogue or part of the FOXG_09391 coding region, which would 296
 247 result in a double mutation. Several transformants were obtained 297
 248 and subjected to polymerase chain reaction (PCR) and Southern 298
 249 analysis, which verified such a deletion of *FTF2*, but no alteration 299
 250 of the *FTF1* copies (Fig. S3A, see Supporting Information). In addi- 300
 251 tion, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction 301
 252 (RT-qPCR) analysis was performed to verify wild-type expression 302
 253 of *FTF1* and the lack of *FTF2* deleted transcript (data not shown). 303
 254 Two transformants were selected for further analyses 304
 255 (SP1 Δ *FTF2*.1 and SP1 Δ *FTF2*.2). First, it was verified that deletion 305
 256 of *FTF2* did not affect growth and sporulation (Table S1 and 306
 257 Fig. S4, see Supporting Information). Then, they were tested for 307
 258 pathogenicity and virulence in inoculation assays of common bean 308
 F4 259 plants. The results in Fig. 4A–D indicate that both transformants 309
 260 show a slight reduction in virulence as measured by the Interna- 310
 261 tional Center for Tropical Agriculture (CIAT) scale, plant weight 311
 262 and disease index. The virulence reduction reverted to the wild- 312
 263 type level when the mutation was complemented with the *FTF2* 313
 264 wild-type allele (Figs S3B, 4A–D).

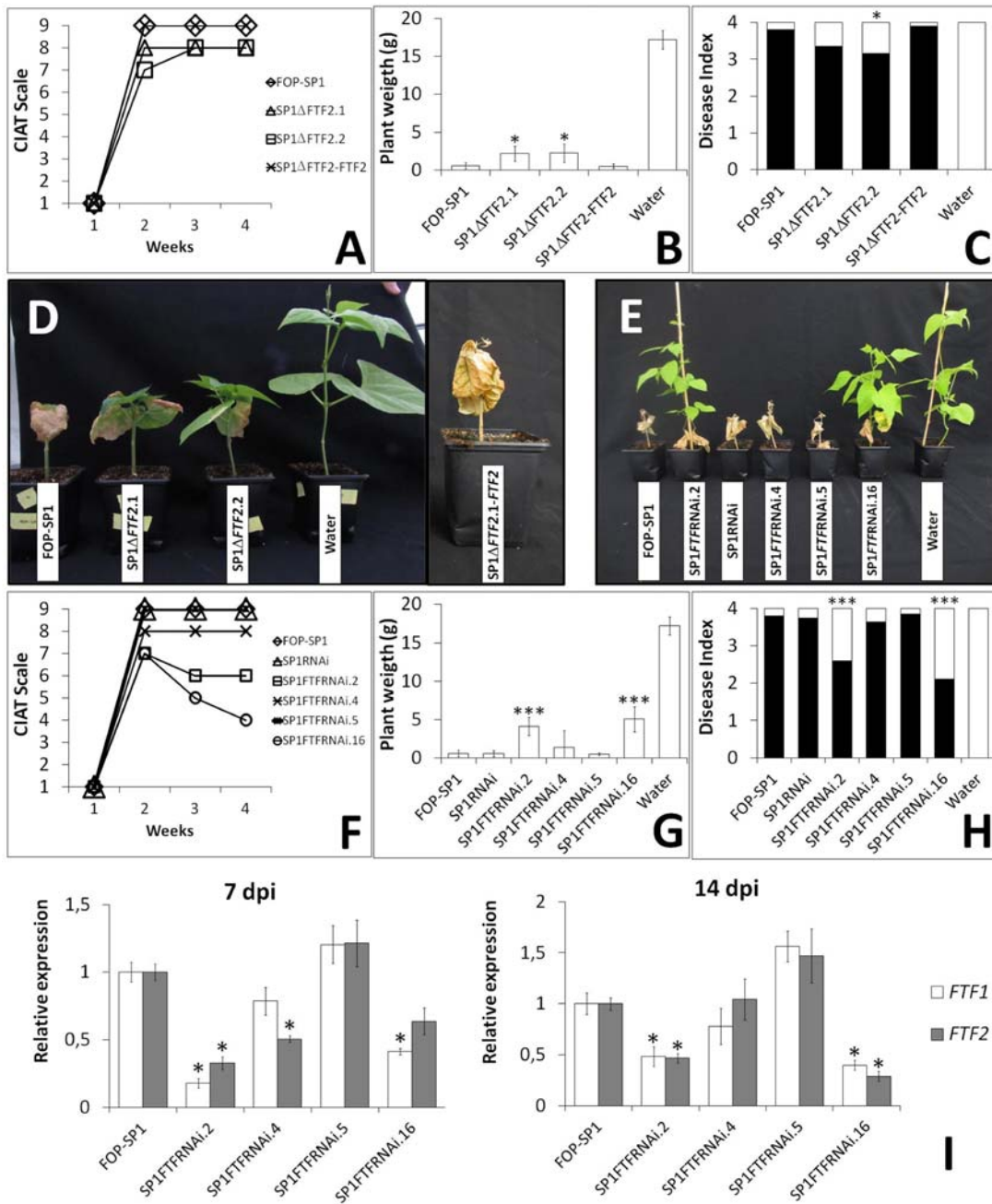
265 For *FTF* gene silencing, we used a construct based on the strat- 314
 266 egy developed in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium* 315
 267 *chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2008) to obtain *FTFRNAi* transformants 316
 268 of the HV *phaseoli* strain FOP-SP1 and the *lycopersici* strain 4287. 317
 269 All the constructs contained a 462-bp *FTF1* fragment to induce 318
 270 gene silencing of *FTF1* and *FTF2* (Fig. S1B), cloned in binary plas- 319
 271 mids harbouring either a gene coding for hygromycin resistance 320
 272 (p $FTFRNAi$ -Hyg) or phleomycin resistance (p $FTFRNAi$ -Phleo). The 321
 273 high similarity between the *FTF1* and *FTF2* ORFs precluded the 322
 274 use of a fragment long enough to induce the specific knockdown 323
 275 of each gene. After transformation of FOP-SP1, the hyg^R trans- 324
 276 formants SP1 $FTFRNAi$.2, SP1 $FTFRNAi$.4 and SP1 $FTFRNAi$.5, the 325
 277 phleo^R transformant SP1 $FTFRNAi$.16 and the hyg^R transformant 326
 278 SP1RNAi, which contains the integrated plasmid backbone with-

out the 462-bp *FTF1* fragment, were selected. Transformants of 279
 strain 4287 were obtained in a similar way. Five representative 280
 transformants obtained with the silencing construct harbouring 281
 the *hph* gene for hygromycin resistance were selected for further 282
 analyses, together with a control transformant obtained with the 283
 same construct lacking the silencing-inducer *FTF1* fragment. All 284
 the selected transformants were analysed by PCR and Southern 285
 hybridizations to verify the integration of the silencing construct 286
 or the control construct without the *FTF1* fragment (Fig. S3C–G). 287
 They were also examined for growth and sporulation in both solid 288
 and liquid media. No significant differences could be observed 289
 between *FTFRNAi* transformants and their respective wild-type 290
 strains (Table S1 and Fig. S4). 291

Silenced FOP-SP1 transformants were tested for pathogenicity 292
 and virulence in common bean plants (*P. vulgaris* L.) (Fig. 4E–H). 293
 All transformants were pathogenic, but differed in virulence. 294
 Transformants SP1 $FTFRNAi$.5 and SP1RNAi showed disease indi- 295
 ces similar to those induced by the HV strain FOP-SP1, measured 296
 using the CIAT scale, the plant weight of inoculated plants or the 297
 disease scale described in Experimental Procedures (Fig. 4F–H, 298
 respectively). In addition, the disease progression rate (DPR) 299
 was similar. Transformant SP1 $FTFRNAi$.4 showed a slightly 300
 reduced disease rating, and transformants SP1 $FTFRNAi$.2 and 301
 SP1 $FTFRNAi$.16 showed a significantly reduced disease rating. 302
 DPR was also lower for these three transformants (6.25 for 303
 SP1 $FTFRNAi$.4, 5 for SP1 $FTFRNAi$.2 and 4.25 for SP1 $FTFRNAi$.16) 304
 when compared with FOP-SP1 (DPR = 7). The virulence reduction 305
 was precisely correlated with the attenuation of *FTF1* and *FTF2* 306
 expression, as measured by RT-qPCR at 7 and 14 days post- 307
 inoculation (dpi) (Fig. 4I). The expression data in Fig. 4I show sig- 308
 nificant differences in the expression of both genes with respect 309
 to normal expression in the wild-type strain FOP-SP1. Differences 310
 ranged from no reduction in SP1 $FTFRNAi$.5 and the control trans- 311
 formant SP1RNAi to more than 50% for *FTF1* in SP1 $FTFRNAi$.16. 312

In a similar way, *FTF*-silenced transformants of the wild-type 313
 4287 were tested in inoculation assays of tomato plants (Fig. 5). 314 F5
 The disease indices estimated for plants inoculated with the 315
 silenced transformants were, in all cases, lower than those 316
 obtained for plants inoculated with the wild-type strain 4287 (Fig. 317
 5C), and the plant survival rate was significantly higher (Fig. 5D). 318
 When *FTF1* and *FTF2* expression in the inoculated plants was ana- 319
 lysed, the correlation between virulence reduction and attenuated 320
FTF expression was not as clear as in common bean inoculations 321
 (Fig. 5E). Most transformants showed a reduction in the expres- 322
 sion of both genes, but, in all, the expression of each gene was 323
 higher than 65% relative to the expression measured in wild-type 324
 4287. 325

Common bean and tomato plants inoculated with transform- 326
 ants accumulating low levels of *FTF* transcripts showed a clear 327
 reduction in Fusarium wilt symptoms. Transformants generated 328



COLOR

Fig. 4 Fusarium wilt induced in common bean plants by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* transformants with reduced expression of *FTF* (*Fusarium transcription factor*). Common bean plants 4 weeks after inoculation with *FTF2*⁻ mutants and complemented mutant (A–D) and inoculation with attenuated expression of *FTF* (E–H). Severity of Fusarium wilt symptoms as measured by: (A, F) the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) scale (the disease index is assigned according to the percentage of chlorotic or necrotic leaves); (B, G) the weight of aerial plant parts 4 weeks after inoculation; (C, H) disease index (assigned according to the number of necrotic vascular vessels and whether or not the plant is dead). (I) Relative expression of the *FTF* genes in root crown [7 days post-inoculation (dpi)] and hypocotyl (14 dpi) of colonized plants, as measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). An arbitrary value of 1.0 was used for the transcript level of *FTF* genes in plants infected with FOP-SP1. Error bars in each panel indicate the standard deviations in three independent biological experiments. The differences between each transformant and the wild-type strain in plant weight (B, G), disease index (C, H) and expression of the *FTF* genes (I) were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett’s test, and indicated by **P* < 0.05 and ****P* < 0.001. FOP-SP1 is a highly virulent (HV) wild-type strain; SP1FTFRNAi.2, SP1FTFRNAi.4 and SP1FTFRNAi.5 are hygromycin-resistant transformants; and SP1FTFRNAi.16 is a phleomycin-resistant transformant harbouring an *FTF1* fragment for the induction of gene silencing; SP1RNAi is a hygromycin-resistant strain which lacks the silencing *FTF1* fragment.

C
O
L
O
R

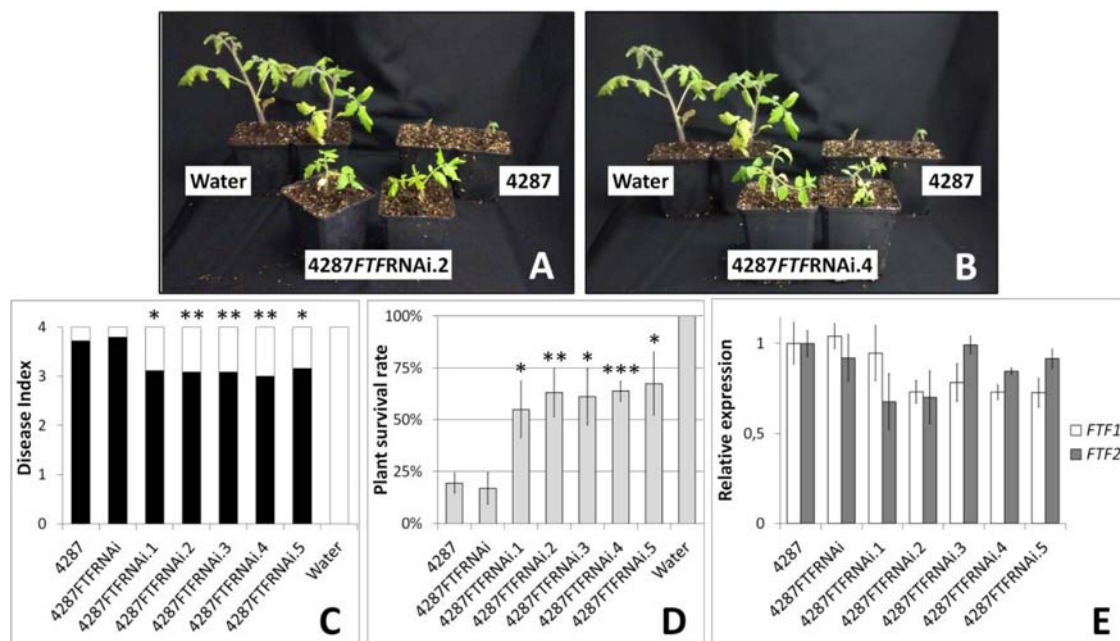


Fig. 5 *Fusarium* wilt induced in tomato plants by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* attenuated transformants. (A, B) Tomato plants 3 weeks after inoculation. Severity of *Fusarium* wilt symptoms 3 weeks after inoculation, as measured by the disease index (C) and plant survival rate (D). (E) Relative expression of the *FTF* (*Fusarium transcription factor*) genes in the root crown of colonized plants at 14 days post-inoculation (dpi), as measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). An arbitrary value of 1.0 was denoted for the transcript level of *FTF* genes in plants infected with the wild-type strain 4287. Error bars indicate the standard deviations obtained in three independent biological experiments. The differences between each transformant and the wild-type strain in the disease index (C) and plant survival rate (D) were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, and are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Transformants 4287FTFRNAi.1-5 and 4287FTFRNAi were obtained with the *hph* plasmid described in Experimental Procedures.

329 with the same construct lacking the *FTF1* fragment responsible for
 330 the formation of double-stranded RNAi (dsRNAi) were as virulent
 331 as the original wild-type strains. These results demonstrate that
 332 dsRNAi transcribed from both promoters in the transforming con-
 333 structs induces gene silencing in *F. oxysporum*. However, the effi-
 334 ciency of gene silencing is greater in the *phaseoli* strain FOP-SP1
 335 than in the *lycopersici* strain 4287. The comparison of the viru-
 336 lence exhibited by the *FTF2*⁻ mutants and the best *FTF* attenuated
 337 mutants indicates a greater contribution to virulence of functional
 338 *FTF1* paralogues with respect to *FTF2*.

339 ***FTF1* does not enhance virulence in a WV strain**

340 The virulence of transformants SP1FTFRNAi.2 and SP1FTFRNAi.16,
 341 as displayed in common bean inoculation assays, reaches final
 342 CIAT scale indices similar to those recorded for WV *F. oxysporum*
 343 f. sp. *phaseoli* isolates (Alves-Santos *et al.*, 2002b), although the
 344 progression of the disease is different. To test whether *FTF1* alone
 345 could be responsible for the virulence differences between HV and
 346 WV strains, the WV strain FOP-SP4 was transformed with a
 347 functional copy of *FTF1* driven by promoter *Pphas14257* (Niño-
 348 Sánchez *et al.*, 2015). Two transformants were selected for inocu-
 349 lation assays. One showed a single integration event, whereas the

other showed three integration events, as demonstrated by PCR 350
 and Southern analysis (Fig. S5, see Supporting Information). 351
 Therefore, the transformants have genetic backgrounds equivalent 352
 to FOP-SP4 plus one or three *FTF1* functional native copies. The 353
 latter has a more similar copy number to the HV strain FOP-SP1. 354
 The results of inoculation assays of common bean plants showed 355
 no significant differences between any of the transformants and 356
 the FOP-SP4 wild-type (Fig. S6A, see Supporting Information). 357
 Transformants of FOP-SP4 were also obtained with a construct, 358
pGpdA::FTF1, which harboured the same copy of *FTF1* formerly 359
 used, driven by the constitutive promoter *PgpdA*. Six transform- 360
 ants were selected and used to inoculate common bean plants, 361
 but none showed significant changes in virulence (Fig. S6B). 362

To assess whether the above results were the consequence of 363
 a lack of transcription of the transformed *FTF1* copy in the genetic 364
 FOP-SP4 background, semi-quantitative RT-PCR analyses were 365
 performed. An *FTF1* cDNA band could be amplified from RNAs 366
 obtained from plants inoculated with transformants harbouring 367
 the *FTF1* copy driven either by the native or constitutive promoter 368
 at 14 days post-infection (Fig. S6C). Therefore, the WV strain is 369
 able to produce *FTF1* transcripts, although with no effect on 370
 virulence. 371

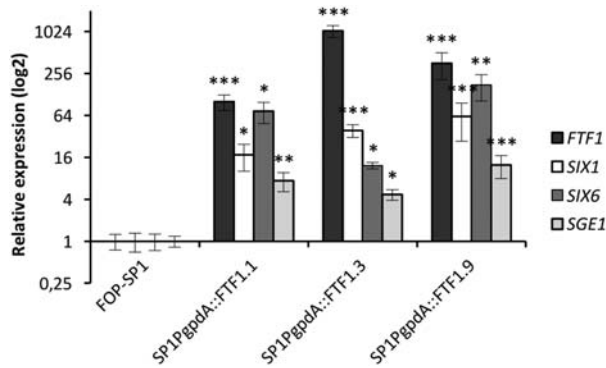


Fig. 6 Gene expression analysis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *PgpdA::FTF1* transformants. Gene expression of the effector-encoding genes *SIX1* (*Secreted In Xylem 1*) and *SIX6* (*Secreted In Xylem 6*) and the transcription factors *SGE1* (*Six Gene Expression 1*) and *FTF1* (*Fusarium transcription factor 1*) was measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in three different *FTF1* constitutive transformants (SP1PgpdA::FTF1.1, SP1PgpdA::FTF1.3 and SP1PgpdA::FTF1.9). The value 1.0 was denoted for the transcript level of the four genes in the wild-type strain FOP-SP1. Error bars indicate the standard deviations in three independent biological experiments. The expression differences between each transformant and the wild-type strain were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, and are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

372 FTF1 is involved in the regulation of virulence factors

373 The former results indicate that other virulence factors, apart from
 374 *FTF1*, are present in HV and absent in WV strains. It has been
 375 shown that the effector genes *SIX1* and *SIX6* share the same
 376 expression pattern as *FTF1* during infection of common bean
 377 (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Our analyses of the FOP-SP4 genome
 378 indicate that this WV strain is devoid of both *SIX1* and *SIX6* genes.
 379 Therefore, the virulence of HV strains could be explained if tran-
 380 scription factor *FTF1* acts as a positive regulator of effector genes,
 381 such as *SIX1* and *SIX6*.

382 To test this hypothesis, we first analysed the expression of
 383 *SIX1* and *SIX6* in *PgpdA::FTF1* transformants of HV strain FOP-SP1,
 384 which constitutively express *FTF1*. We included in the analysis the
 385 gene coding for the transcripton factor *SGE1* (*Six Gene Expression*
 386 *1*), as it has been proposed to regulate the expression of some *SIX*
 387 genes in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Michiels *et al.*, 2009).
 388 RT-qPCR analyses performed with RNA obtained from three inde-
 389 pendent transformants grown for 72 h in liquid culture showed a
 390 drastic induction of *FTF1*, which correlated with the induction of
 391 the three genes analysed (Fig. 6). These results support those pre-
 392 viously obtained, which correlated *FTF1*, *SIX1* and *SIX6* expression
 393 during host colonization (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

394 Second, we took advantage of the RNAi transformants
 395 obtained from the *phaseoli* and *lycopersici* wild-type strains to
 396 compare the expression during host colonization. Figure 7 shows
 397 the expression of the three genes analysed in common bean plants

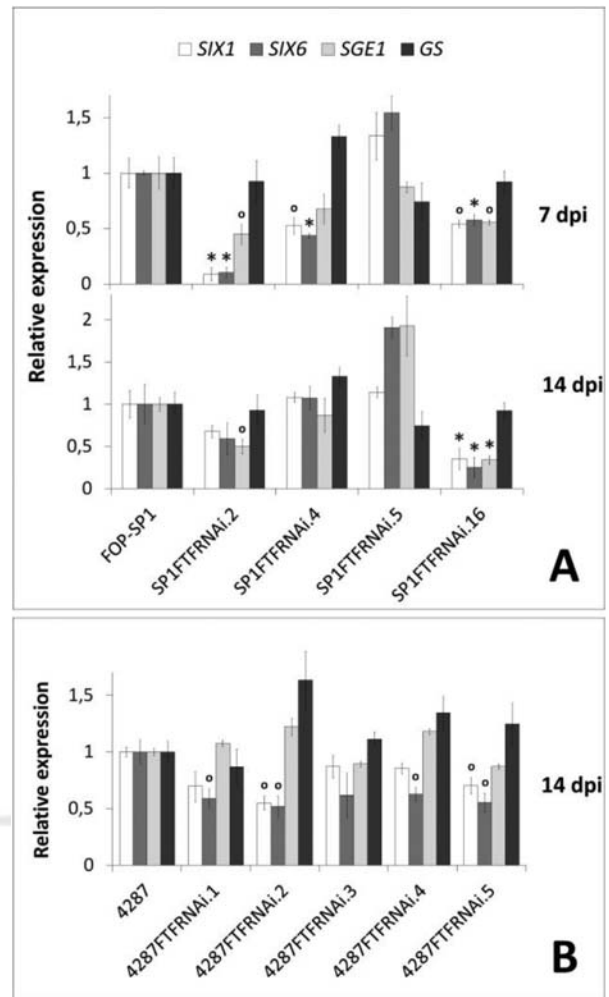


Fig. 7 Gene expression analysis in *Fusarium oxysporum* attenuated transformants. The expression of the effector-encoding genes *SIX1* (*Secreted In Xylem 1*) and *SIX6* (*Secreted In Xylem 6*), the transcription factor *SGE1* (*Six Gene Expression 1*) and the glutamine synthetase gene (*GS*), used as control, was measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in inoculated common bean plants at 7 and 14 days post-inoculation (dpi) (A) and inoculated tomato plants at 14 dpi (B). FOP-SP1 and 4287 are *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *lycopersici* wild-type strains, respectively; SP1FTFRNAi.2, SP1FTFRNAi.4, SP1FTFRNAi.5 and 4287FTFRNAi.1–5 are hygromycin-resistant silenced transformants; SP1FTFRNAi.16 is a phleomycin-resistant silenced transformant. The value 1.0 was denoted for the transcript level of all genes in the wild-type strains FOP-SP1 and 4287. Error bars indicate the standard deviations obtained in three independent biological experiments. The differences between each transformant and the wild-type strain were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, and are indicated by * $P < 0.05$ and † $P < 0.1$.

(Fig. 7A) and tomato plants (Fig. 7B) inoculated with the same
 398 transformants, harbouring the silencing construct, as described
 399 previously. The greatest reduction in *SIX1* and *SIX6* expression
 400 ($P < 0.05$) corresponds to plants inoculated with SP1FTFRNAi.2
 401

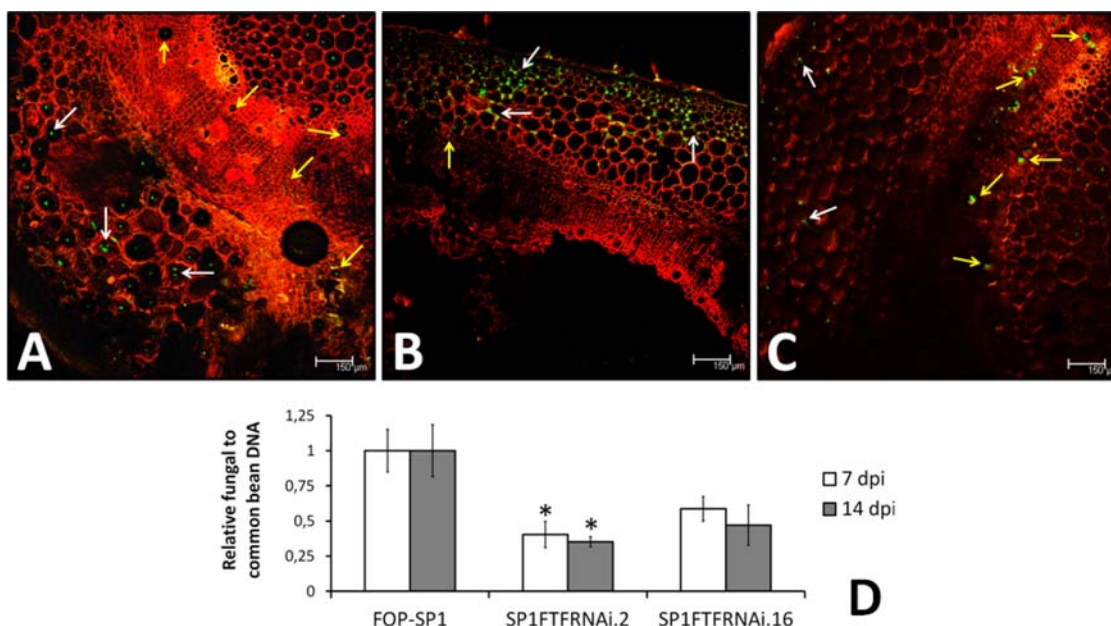


Fig. 8 Plant colonization by green fluorescent protein (GFP)-expressing transformants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Cross-sections of hypocotyls of common bean plants inoculated with GFP-expressing transformants derived from the weakly virulent (WV) strain FOP-SP4 (A), the highly virulent (HV) strain FOP-SP1 (B) (Niño-Sánchez *et al.*, 2015) and the SP1FTFRNAi.16 attenuated strain (C) were examined by confocal laser microscopy. Hyphae growing in the parenchyma region are indicated by white arrows, whereas hyphae growing inside the xylem vessels are indicated by yellow arrows. Fungal biomass was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in plants inoculated with FOP-SP1 and two attenuated transformants (SP1FTFRNAi.2 and SP1FTFRNAi.16). Fungal DNA relative to common bean DNA was measured by assaying the fungal *EF1 α* gene and the plant *actin* gene by qPCR using DNA extracted from the root crown at 7 days post-inoculation (dpi) and hypocotyls at 14 dpi. All measurements were referred to the arbitrary value of unity obtained during FOP-SP1 colonization. The differences between each transformant and the wild-type strain were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, and are indicated by * $P < 0.05$.

COLOR

402 (7 dpi) and SP1FTFRNAi.16 (14 dpi), the transformants that
 403 showed the minimum expression of *FTF1*. SP1FTFRNAi.4
 404 showed a clear reduction in *SIX6* expression at 7 dpi ($P < 0.05$)
 405 and intermediate levels of expression of the other genes, in agree-
 406 ment with the intermediate expression shown by the *FTF* genes
 407 (see Fig. 4I). Transformant SP1FTFRNAi.5 showed no reduction in
 408 either *FTF1* or the three genes analysed. Some of the best silenced
 409 transformants in *FTF1* derived from the *lycopersici* wild-type strain
 410 4287, 4287FTFRNAi.2, 4287FTFRNAi.4 and 4287FTFRNAi.5, also
 411 showed the greatest reduction in the expression of the effector
 412 genes. The expression of the gene encoding the transcription factor
 413 *SGE1* was significantly reduced in the best silenced transformants
 414 of the *phaseoli* strain, in a similar manner to the effector
 415 genes analysed. This result, together with the induction observed
 416 in the transformants constitutively expressing *FTF1*, demonstrates
 417 that *SGE1*, *SIX1* and *SIX6* are under positive regulation by *FTF1*,
 418 either directly or indirectly. The results obtained with the *FTF*-
 419 silenced *lycopersici* strain indicate that *SIX1* and *SIX6* are under
 420 *FTF1* positive regulation, but are less conclusive concerning *SGE1*.

421 Host plant colonization by silenced strains

422 In a former study, we showed that WV and HV strains of
 423 *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* not only differ in the severity of symp-

424 toms caused in the host plant (virulence), but also in the coloniza-
 425 tion pattern: HV strains accumulate more mycelium in infected
 426 tissues and are almost exclusively restricted to vascular vessels
 427 (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

428 To analyse the morphological pattern of host colonization by
 429 the silenced transformants, one transformant, SP1FTFRNAi.16,
 430 was transformed with a construct harbouring the *GFP* (green fluo-
 431 rescent protein) gene under the control of the constitutive pro-
 432 moter *PgpdA*. After checking for the correct integration and
 433 expression of *GFP* (data not shown), one of the SP1FTFRNAi.16-
 434 *GFP* transformants was selected for inoculation tests. This silenced
 435 transformant displayed a colonization pattern resembling that
 436 exhibited by the WV strain FOP-SP4, characterized by extensive
 437 growth around the parenchymal cells of the cortex and limited
 438 growth inside the vascular vessels (Fig. 8A,B), in contrast with the
 439 pattern observed in plants inoculated with FOP-SP1 (Fig. 8C).
 440 The proportion of colonized vessels measured by image analysis was
 441 $31.59\% \pm 4.89\%$, a value closer to that obtained for FOP-SP4
 442 ($11.39\% \pm 7.03\%$) than to that obtained for FOP-SP1
 443 ($81.06\% \pm 8.8\%$) (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). The quantification
 444 of fungal biomass accumulation in infected plants, measured by
 445 RT-qPCR, showed that silenced transformants accumulate less
 446 mycelium than the wild-type HV strain FOP-SP1 (Fig. 8B). The larg-
 447 est difference was observed at 7 dpi, in agreement with the

F8

448 observations made in the above-mentioned study. Again, the phe- 497
449 notype showing the most significant difference from the wild-type 498
450 strain was displayed by SP1*FTFRNAi.2*, one of the most attenu- 499
451 ated transformants. 500

452 Both results indicate that *FTF* knockdown transformants 501
453 obtained in an HV genetic background show a host colonization 502
454 pattern similar to that displayed by the WV strain FOP-SP4, which 503
455 is devoid of *FTF1* copies. 504

456 DISCUSSION

457 The expansion of some gene families encoding transcription fac- 505
458 tors in *F. oxysporum* is a striking question that addresses the 506
459 genetic bases of virulence and host specificity in this species com- 507
460 plex. In this study, we analysed *FTF* gene expansion, composed of 508
461 the core genome *FTF2* gene and several paralogues of the LS 509
462 *FTF1* gene. *FTF2* is well conserved in all filamentous fungi. A 510
463 single copy of this gene is present in all genomes available to date 511
464 in FOXC, and also in sets of isolates experimentally found to be 512
465 non-pathogenic, WV and HV to common bean plants. The 513
466 *F. graminearum* mutant seems to be altered only in ascospore 514
467 production and discharge (Son *et al.*, 2011), but this phenotype 515
468 would not be relevant in *F. oxysporum* as this fungus does not 516
469 seem to reproduce sexually. We found that *FTF2* mutants of 517
470 *F. oxysporum* do not display apparent growth or sporulation 518
471 abnormalities in solid and liquid culture, respectively, but show a 519
472 slight reduction in virulence. In contrast, the *FTF1* paralogues are 520
473 exclusive to *F. oxysporum* and can be found in a variable number 521
474 of copies, which is related both to the forma specialis analysed 522
475 and the virulence displayed, as shown in this work and in previ- 523
476 ous reports (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Schmidt *et al.*, 2013; de 524
477 Vega-Bartol *et al.*, 2011). Additional lines of evidence point to the 525
478 role of these paralogues in virulence, such as the expression dur- 526
479 ing plant infection (Niño-Sánchez *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2007) 527
480 and the correlation between the copy number and virulence dis- 528
481 played (de Vega-Bartol *et al.*, 2011). However, direct confirmation 529
482 of the role of *FTF1* as a virulence factor is lacking because of the 530
483 experimental problems involving the construction of deletion 531
484 mutants in all the paralogues. We have successfully used RNA- 532
485 mediated gene silencing to attenuate the expression of the *FTF* 533
486 genes, and found that mutants most effectively silenced (less 534
487 than 50% of *FTF1* expression) show an important reduction in vir- 535
488 ulence. Constructs expressing dsRNA complementary to target 536
489 sequences were obtained by placing a fragment of the *FTF1* gene 537
490 between two promoters in opposite orientations, following the 538
491 design successfully deployed in other fungi (Ullán *et al.*, 2008). 539
492 The sense and antisense strands form a dsRNA that triggers gene 540
AQ4 493 silencing (Lee *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). The presence of a 541
494 unique *NcoI* cloning site between the two strong promoters (Ullán 542
495 *et al.*, 2008) allows for easy insertion of DNA fragments from the 543
496 genes of interest. This feature implemented in a binary vector 544
545
546

497 harbouring an antibiotic resistance cassette for selection (we have 498
499 successfully used both the *hph* and *ble* genes) results in a system 500
501 for easy gene silencing in any strain of *F. oxysporum*. This system 502
503 would be a useful tool to facilitate the functional analysis of gene 504
505 expansions, such as that described here, where the deletion of all 506
507 the copies is not feasible. The correlation between the attenuation 508
509 of gene expression and reduction in virulence was observed in 509
510 both the *phaseoli* and *lycopersici* transformants, although, for 510
511 unknown reasons, gene silencing is more effective in transform- 511
512 ants obtained from FOP-SP1 than in those obtained from strain 512
513 4287. Silencing efficiency may show variations between strains, 513
514 as reduced attenuation of gene expression has also been reported 514
515 in *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 5176, although, in this case, 515
516 the silencing method relied on the expression of hairpin RNA 516
517 transgenes (Schumann *et al.*, 2013). In addition, it is worth noting 517
518 that the number of copies of *FTF1* is higher in 4287 than in FOP- 518
519 SP1. The reduction in virulence shown by the attenuated mutants 519
520 is proportionally greater than that shown by the *FTF2* mutants, 520
521 supporting a more important role in virulence for the *FTF1* 521
522 paralogues than for the *FTF2* core genome gene. 522

523 The best-described TF gene expansions involved in the patho- 523
524 genicity of *F. oxysporum* are *EBR1*, with the four paralogues 524
525 *EBR2*, *EBR3*, *EBR4* and *EBR5*, and *FOW2* (FOXG_06378), with two 525
526 paralogues, FOXG_12458 and FOXG_21393. The deletion of 526
527 *EBR1* causes a minor reduction in virulence towards tomato plants 527
528 and reduced radial growth in complete medium (Jonkers *et al.*, 528
529 2013), which is also observed in the deletion mutants obtained in 529
530 *F. graminearum* (Zhao *et al.*, 2011). The mutant phenotype 530
531 observed in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* when *EBR1* is deleted 531
532 is substantially restored by a copy of *EBR2* placed under the con- 532
533 trol of the *EBR1* promoter. The gene predominantly expressed, 533
534 both during culture and tomato colonization, is *EBR1*. When *EBR1* 534
535 is deleted, the majority of transcripts detected during growth in 535
536 complete medium correspond to *EBR3* and, to a lesser extent, to 536
537 *EBR2*; the opposite occurs during tomato colonization (Jonkers 537
538 *et al.*, 2013). Taken together, these results indicate that *EBR1* and 538
539 the paralogues *EBR2* and *EBR3* have redundant roles during both 539
540 saprophytic and *in planta* growth, whereas *EBR4* and *EBR5* are 540
541 barely expressed in both conditions. *EBR1* is located in the core 541
542 genome, whereas the copies of *EBR2*, *EBR3* and *EBR4* are located 542
543 in LS chromosomes. Similarly, copy FOXG_06378 of *FOW2* is 543
544 located in the core genome (chromosome 2), whereas the two 544
545 paralogues are located in LS chromosomes (FOXG_12458 in chro- 545
546 some 3 and FOXG_21393 in chromosome 6). Deletion of 546
547 *FOW2* in *F. oxysporum* f. sp. *melonis* causes a complete loss of 547
548 pathogenicity (Imazaki *et al.*, 2007), whereas *FOW2* insertional 548
549 mutants in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* show a decrease of 549
550 50% relative to the wild-type level of virulence (Michielse *et al.*, 550
551 2009), which suggests that insertions may have occurred in the 551
552 paralogues. 552

None of the above-described gene expansions have been shown to be involved in the main characteristic of *F. oxysporum*, its ability to grow and spread through the vascular system of the plant host. On the contrary, the phenotypic features of transformants attenuated in *FTF* expression strongly suggest a role of the *FTF1* paralogues in vascular colonization. In addition to the reduction in virulence demonstrated in the pathogenicity assays, *FTF*-silenced transformants show: (i) lower accumulation than HV strains of fungal biomass in infected host tissues; (ii) a change in the colonization pattern, from almost exclusively vascular to a mixture of parenchymal and vascular; and (iii) the majority of fungal biomass (68%) accumulates around the parenchymal cells instead of inside the xylem vessels. These three features are also main differences that distinguish WV strains from HV strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. As shown in previous studies, HV strains are true and almost exclusive vascular colonizers that highly express the *FTF1* transcription factor during plant infection, whereas WV strains are better colonizers of parenchyma and lack the *FTF1* paralogues (Niño-Sánchez *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2007). Furthermore, the presence of extra *FTF1* paralogues correlates with enhanced virulence when SV strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* infect *P. coccineus* L. (de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Therefore, we propose that *FTF1* paralogues encode a transcription factor required for enhanced virulence and heavy colonization of the host vascular system.

The *FTF* genes encode transcription factors of the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA-binding type (Todd and Andrianopoulos, 1997). If the expression of *FTF1* paralogues, or *FTF1* together with *FTF2*, is needed for effective colonization and spread through the xylem vessels, their most attractive targets would be genes whose products are involved in the vascular lifestyle of *F. oxysporum*. The best-known groups of molecules that work as specialized pathogenicity factors in *F. oxysporum* are the small, cysteine-rich proteins encoded by the *SIX* genes (Michielse and Rep, 2009). *SIX* genes play an important role in the determination of host specificity and the establishment of gene-for-gene interactions between *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and its tomato host (Houterman *et al.*, 2008; Rep *et al.*, 2004). We have found direct evidence that strongly suggests that *SIX1* and *SIX6* genes, both present in the genome of HV *phaseoli* strains, but absent in the genome of WV strains, are activated by the *FTF1* transcription factor. First, mutants that constitutively express *FTF1* show enhanced *SIX1* and *SIX6* expression. Second, *FTF*-silenced transformants show reduced expression of both genes. These results support the correlation previously found between *FTF1* up-regulation during host colonization and increased expression of *SIX1* and *SIX6* (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). It has been reported that *SIX* expression is dependent on the expression of another transcription factor encoded by the gene *SGE1*, as the expression of several *SIX* genes is lost in a deletion mutant of *SGE1* (Michielse *et al.*, 2009). Our

results show that *SGE1* is also up-regulated in the *phaseoli* strain constitutively expressing *FTF1*, whereas *SGE1* expression is down-regulated in *FTF*-silenced strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Therefore, *SGE1* is also likely to be under the control of *FTF1*, at least in *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, thus making the *FTF1* transcription factor a regulator of effector expression.

The variability shown by *FTF* gene expansion, with up to seven similar genes in strain 4287, is higher than in the case of *EBR* and *FOW* expansions. This range of variability, together with the finding that some paralogues are probably not functional because of structural reasons (this work), suggests that the *FTF* gene family has evolved by gene duplication of an ancestral unique gene, most probably *FTF2*, and the subsequent accumulation of mutations in the duplicated copies. The *FTF1* paralogues are located in LS regions enriched in transposons (Ma *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2013), whose movement could have originated the duplications. The data presented here demonstrate that some of these mutations have determined a functional specialization of the *FTF1* paralogues, which is closely related to the ability to colonize the vascular system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fungal strains and culture conditions

The *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains FOP-SP1 (HV) and FOP-SP4 (WV) (Alves-Santos *et al.*, 1999, 2002a; Armstrong and Armstrong, 1975; Booth, 1971), and the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 strain 4287 (Di Pietro *et al.*, 1998), were used in this study. All strains were grown as described previously (Alves-Santos *et al.*, 1999; de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Fungal cultures were established from frozen mycelia stored on 25% glycerol v/v at -80 °C, and incubated at 25 °C with continuous light for 1 week (solid medium) or 5 days at 120–180 rpm (liquid cultures).

Pathogenicity tests

Inoculation of *P. vulgaris* L. cv. Blanca Riñón with conidia from *F. oxysporum* strains and transformants was carried out as described previously (Alves-Santos *et al.*, 1999). After inoculation, the plants were transferred to pots and further incubated in a glasshouse for regular pathogenicity assays, or to 50-mL Falcon® tubes filled with PGM (Plant Growth Medium) solution, covered with foil and incubated as described previously (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Inoculation of tomato cultivar Money Maker was performed as described previously (Di Pietro *et al.*, 1998). Plant infection tests were repeated three times in a randomized design and a total of 60 plants were analysed. Disease severity was measured by assessment of the disease symptoms recorded according to the CIAT scale (Alves-Santos *et al.*, 1999; Pastor-Corrales and Abawi, 1987), weighing the mass of the aerial part of inoculated plants, quantification of the DPR (García-Sánchez *et al.*, 2010) and evaluation of the affected vascular vessels according to the tomato disease index (Rep *et al.*, 2004).

643 **Isolation of *FTF2***

644 A genomic library was constructed with DNA from strain FOP-SP4 as
 645 described previously (Ramos *et al.*, 2007). To identify the *FTF2* gene, 4000
 646 recombinant phages were screened using the probe B285-A5, which con-
 647 tains part of the promoter and the 5' coding region of *FTF1*. DNA purified
 648 from the positive phage clones was digested with different restriction
 649 enzymes and subjected to Southern blot analysis with several probes
 650 derived from the coding region of *FTF1*. DNA fragments corresponding to
 651 hybridization bands were subcloned into pBluescripts KS+ vector and
 652 sequenced using the same primers as designed for sequencing of the *FTF1*
 653 gene (Ramos *et al.*, 2007). The nucleotide sequence of gene *FTF2* is avail-
 654 able in GenBank under Accession No. JN167165.

655 **Construction of silencing and disruption vectors and
656 generation of mutants**

657 Plasmid p*FTF2*-KO was constructed to inactivate the gene *FTF2* in FOP-
 658 SP1. To prevent the partial deletion of the FOXG_09391 ORF, contiguous
 659 to the 3' end of *FTF2* (locus FOXG_09390), primers Inac-*FTF2*-A3 and
 660 Inac-*FTF2*-A4 were designed to PCR amplify a 776-bp DNA fragment from
 661 the 3' end of the *FTF2* coding region. An 844-bp DNA fragment was
 662 amplified from the 5' flanking region of *FTF2* using primers Inac-*FTF2*-O1
 663 and Inac-*FTF2*-O2. Both fragments were PCR amplified using DNA from
 664 strain FOP-SP4 as template and cloned into pRF-HU2 digested with *Pad*
 665 and *Nt.BbvCI* USERTM enzymes (Frandsen *et al.*, 2008).

666 Plasmids p*FTF*Phleo-RNAi and p*FTF*Hyg-RNAi were designed on the
 667 basis of the dsRNA expression cassette from pJL43-RNAi (Ullán *et al.*,
 668 2008) and the binary vector pRF-HU2 (Frandsen *et al.*, 2008). For plasmid
 669 p*FTF*Phleo-RNAi construction, first the hygromycin resistance cassette in
 670 pRF-HU2 was excised by digestion with restriction enzymes *Pad* and
 671 *Nt.BbvCI*. Then, a PCR fragment containing the *PpbC* promoter of the
 672 *Penicillium chrysogenum pcbC* gene and the *PgpdA* promoter of the
 673 *Aspergillus nidulans* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene,
 674 together with the *ble* gene under the control of the glutamate dehydro-
 675 genase promoter (*Pgdh*) of *Aspergillus awamori*, was amplified using
 676 pJL43-RNAi as template and primers RNAi-U1 and RNAi-U4. This 3406-bp
 677 amplicon was cloned into pRF-HU2 digested with *Pad* and *Nt.BbvCI*
 678 USERTM enzymes (Frandsen *et al.*, 2008), yielding plasmid pPhleo-RNAi.
 679 Primers Sil*FTF2*F-NcoI and Sil*FTF2*R-NcoI were used to amplify a 462-bp
 680 fragment, containing a conserved *FTF* sequence, using DNA from FOP-SP4
 681 as template. Finally, the 474-bp amplicon and plasmid pPhleo-RNAi were
 682 digested with restriction enzyme *NcoI* and ligated using T4 DNA ligase to
 683 obtain p*FTF*Phleo-RNAi. To obtain p*FTF*Hyg-RNAi, primers RNAi-User1 and
 684 RNAi-User2 were used to PCR amplify a 1.7-kb DNA fragment employing
 685 p*FTF*Phleo-RNAi as template. This amplicon contains the double-stranded
 686 expression cassette with the *FTF* sequence cloned in the internal *NcoI* site.
 687 The 1.7-kb DNA fragment was cloned into pRF-HU digested with *Pad* and
 688 *Nt.BbvCI* USERTM enzymes.

689 Complementation of *FTF2*⁻ mutants was performed by transformation
 690 with plasmid p*FTF2*, which contains the wild-type allele *FTF2* from strain
 691 FOP-SP4 and the *ble* gene for phleomycin resistance. First, plasmid pRF-
 692 HU was digested with the enzymes *ApaI* and *ScaI* to excise a fragment
 693 containing the *hph* gene. Then, a fragment containing the phleomycin
 694 resistance cassette was PCR amplified using primers PhleoF-*ApaI* and

PhleoR-*ScaI* and DNA from plasmid pJL43-RNAi. This amplicon was 695
 696 ligated to the formerly digested plasmid pRF-HU, thus replacing the *hph*
 697 gene by the *ble* gene. Finally, a 4717-bp amplicon containing the wild-
 698 type allele *FTF2* was obtained using primers Prom*FTF2*USER-F and
 699 Ter*FTF2*USER-R and DNA from strain FOP-SP4 as template, and ligated to
 700 the formerly obtained plasmid digested with *Pad* and *Nt.BbvCI* USERTM
 701 enzymes.

702 Plasmid p*FTF1* was constructed to express the gene *FTF1* in the strain
 703 FOP-SP4 under the control of its native promoter. A DNA fragment was
 704 amplified using primers B310User and M40Auser, and DNA from FOP-SP1
 705 as template. The 4890-bp amplicon contains the *FTF1* paralogue homolo-
 706 gous to FOXG_14257 in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and contains the
 707 ORF together with 670 bp of the promoter region and 1 kb of the 3' non-
 708 translated region. The amplicon was ligated to pRF-HU digested with *Pad*
 709 and *Nt.BbvCI* USERTM enzymes. In a similar way, plasmid p*PgpdA::FTF1*
 710 was constructed to express the gene *FTF1* under the constitutive control
 711 of the *PgpdA* promoter and the *TrpC* terminator harboured by pRF-HUE.
 712 Primers *FTF1*UserF and *FTF1*UserR were used in PCRs with DNA from
 713 FOP-SP1 as template. The amplicon contains the complete ORF of the
 714 *phaseoli* paralogue homologous to FOXG_14257 in *F. oxysporum* f. sp.
 715 *lycopersici*, and was ligated to pRF-HUE digested with *Pad* and *Nt.BbvCI*
 716 USERTM enzymes (Frandsen *et al.*, 2008).

717 All the constructs were used to genetically transform *F. oxysporum*
 718 employing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation pro-
 719 cedure as described previously (Mullins *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2007).

720 **Construction of GFP-expressing strains**

721 Transformants of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* attenuated in the expres-
 722 sion of *FTF1* and *FTF2* were genetically transformed to express GFP and
 723 verified for normal pathogenicity, as described previously (Niño-Sánchez
 724 *et al.*, 2015).

725 **Confocal laser microscopy**

726 The plants inoculated with FOP-SP1, FOP-SP4 and the attenuated trans-
 727 formants expressing GFP were maintained in hydroponic cultures and
 728 examined each day for a period of 21 days after infection, as described
 729 previously (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). The quantification of xylem vessel
 730 colonization was performed with the help of ImageJ and carried out as
 731 described previously (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

732 **Nucleic acid manipulations**

733 Genomic DNA was extracted from *F. oxysporum* mycelium according to
 734 the procedures described previously (Alves-Santos *et al.*, 1999, 2002b;
 735 Ramos *et al.*, 2007). RNA was extracted from common bean and tomato
 736 plants at different times after inoculation with *F. oxysporum* strains and
 737 transformants. Roots and hypocotyls were cut and immediately frozen at
 738 80 °C and ground in a pestle and mortar under liquid nitrogen. Southern
 739 blots were carried out as described previously (Ramos *et al.*, 2007). DNA
 740 probes were labelled with digoxigenin-dUTP (Roche Diagnostics) by the
 741 PCR method using Biotools DNA Polymerase (Biotools SA, Spain). Prehy-
 742 bridization, hybridization, washing and detection were performed using a
 743 chemiluminescent detection procedure employing CDP-Star (Roche Diag-
 744 nostics) according to the manufacturer's recommendations.

AQ5
AQ6

- 745 Real-time quantitative analysis of gene expression**
746 and fungal biomass quantification
- 747 Samples of plants inoculated with *F. oxysporum* were collected and frozen
 748 at -80°C . Total RNA was extracted and DNAase was treated using the
 AQ7 749 SV Total RNA Isolation System Z3105 (Promega) according to the manu-
 750 facturer's recommendations. RNA quantification and cDNA synthesis were
 751 performed as described previously (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). The effi-
 752 ciency of each pair of primers was verified as described previously (Niño-
 753 Sánchez *et al.*, 2015). Amplifications were performed in a StepOnePlus™
 754 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) accord-
 755 ing to the manufacturer's recommendations. The *F. oxysporum* *EF1 α* gene
 756 and the common bean actin gene were used as endogenous reference
 757 genes. The relative expression levels of each gene were calculated by the
 758 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Three sets of samples from
 759 different infection assays were used (biological replicates), two independ-
 760 ent cDNA preparations per biological replicate were obtained and three
 761 replicates of each cDNA were analysed to calculate the mean and stand-
 762 ard deviation. All the primers used in RT-qPCR experiments and in the
 763 construction of vectors are listed in Table S2 (see Supporting Information).
 764 Fungal biomass in inoculated plant samples was estimated as
 765 described previously (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).
- 766 Similarity analysis**
- 767 Similarity searches were performed with the BLAST program against public
 768 DNA/protein databases [National Center for Biotechnology Information
 769 (NCBI) and Broad Institute]. The alignment of *FTF2* homologous sequen-
 770 ces and the comparison of *FTF1* and *FTF2* sequences were made with the
 AQ8 771 help of the Geneious program (Biomatters, New Zealand) and its default
 772 parameters (IUB cost matrix, neighbour joining, Tamura-Nei distance
 773 model) for MUSCLE/CLUSTALW and GBLOCKS. Phylogenetic reconstructions
 774 were performed using PhyML and evaluated using a bootstrap test with
 775 100 replications. The motifs, regions and domains of *FTF2* were character-
 776 ized at the Broad website (www.broadinstitute.org) and annotated with
 777 the Geneious program.
- 778 ACKNOWLEDGEMENTS**
- 779 This research was supported by grant AGL2012-39876-C02-01 from
 AQ9 780 MINECO (Spain). J. Niño-Sánchez and V. Casado-del Castillo were recipi-
 781 ents of fellowships AP2009-3559 and AP2010-2742, respectively, from
 782 MECO (Spain). V. Tello held a postdoctoral position financed by grant
 783 AGL2012-39876-C02-01. We are indebted to Ricardo V. Ullán for the
 784 pJL43-RNAi plasmid and excellent advice on gene silencing, and M. R.
 785 Thon and E. P. Benito for critical reading of the manuscript and many valu-
 786 able suggestions.
- AQ10 787 REFERENCES**
- 788 Alves-Santos, F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P. and Díaz-Minguez, J.M. (1999)
 789 Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain.
 790 *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3335–3340.
 791 Alves-Santos, F., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J.M., Martín-Dominguez,
 792 R., García-Benavides, P., Crespo, M.C., Díaz-Minguez, J.M. and Eslava, A.P.
 793 (2002a) Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pha-*
 794 *seoli* 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-
 Minguez, J.M. (2002b) A DNA-based procedure for *in planta* detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, **92**, 237–244.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1975) Reflections on the Wilt Fusaria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 95–103.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. In: *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy* (Cook, R., ed), pp. 391–399. Penn State University Press.
- Booth, C. (1971) *The Genus Fusarium*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F., Huertas-González, M., Ruiz-Roldan, M., Caracuel, Z., Barbieri, A. and Roncero, M. (1998) Endopolygalacturonase PG1 in different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1967–1971.
- 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.
- García-Sánchez, M. A., Martín-Rodrigues, N., Ramos, B., de Vega-Bartol, J.J., Perlin, M.H. and Díaz-Minguez, J.M. (2010) *fo*t12, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor *Ste12*, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 216–225.
- 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–e1000066.
- 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.
- 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. (2013) *EBR1* genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environ. Microbiol.* **16**, 1982–2003.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. *Methods*, **25**, 402–408.
- 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., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Diener, A., Gale, L.R., Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C. and Rep, M. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, **464**, 367–373.
- May, G.S., McGoldrick, C.A., Holt, C.L. and Denison, S.H. (1992) The *bimB3* mutation of *Aspergillus nidulans* uncouples DNA replication from the completion of mitosis. *J. Biol. Chem.* **267**, 15 737–15 743.
- Michielse, C.B. and Rep, M. (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 311–324.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B.J. and Rep, M. (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol.* **10**, R4.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C. and Rep, M. (2009) The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog.* **5**, e1000637.
- Mullins, E., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. and Kang, S. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, **91**, 173–180.
- Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M.R., Benito, E.P. and Díaz-Minguez, 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**, 234.
- 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**, 990–993.
- Ramos, B., Alves-Santos, F.M., García-Sánchez, M.A., Martín-Rodrigues, N., Eslava, A.P. and Díaz-Minguez, J.M. (2007) The gene coding for a new transcription factor (*ftt1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 864–876.

- 865 Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M.,
866 Dekker, H.L., de Koster, C.G. and Cornelissen, B.J.C. (2004) A small, cysteine-
867 rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem
868 vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* **53**,
869 1373–1383.
- 870 Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996) Comparative amino acid sequence analysis
871 of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **24**,
872 4599–4607.
- 873 Schmidt, S.M., Houterman, P.M., Schreiver, I., Ma, L., Amyotte, S.,
874 Chellappan, B., Boeren, S., Takken, F.L.W. and Rep, M. (2013) MITEs in the
875 promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium*
AQ15 876 *oxysporum*. *BMC Genomics*, **14**, 1–1.
- 877 Schumann, U., Smith, N.A., Kazan, K., Ayliffe, M. and Wang, M.-B. (2013) Analy-
878 sis of hairpin RNA transgene-induced gene silencing in *Fusarium oxysporum*.
AQ16 879 *Silence*, **4**, 1–1.
- 880 Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., Park, A.R., Lee, J., Jin, J.M., Lin, Y., Cao, P., Hong,
881 S.Y., Kim, E.K., Lee, S.H., Cho, A., Lee, S., Kim, M.G., Kim, Y., Kim, J.E., Kim,
882 J.C., Choi, G.J., Yun, S.H., Lim, J.Y., Kim, M., Lee, Y.H., Choi, Y.D. and Lee,
883 Y.W. (2011) A phenome-based functional analysis of transcription factors in the
AQ17 884 cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002310.
- 885 Todd, R.B. and Andrianopoulos, A. (1997) Evolution of a fungal regulatory gene
886 family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.*
887 **21**, 388–405.
- 888 Ullán, R.V., Godio, R.P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R.,
889 Kosalkova, K. and Martín, J.F. (2008) RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum*
890 and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using β -lactam genes expres-
891 sion. *J. Microbiol. Methods*, **75**, 209–218.
- 892 de Vega-Bartol, J.J., Martín-Domínguez, R., Ramos, B., García-Sánchez, M.-A.
893 and Díaz-Mínguez, J.M. (2011) New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f.
894 sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* cor-
895 relates with virulence. *Phytopathology*, **101**, 470–479.
- 896 Zhao, C., Waalwijk, C., de Wit, P.J.G.M., van der Lee, T. and Tang, D. (2011)
897 EBR1, a novel Zn(2)Cys(6) transcription factor, affects virulence and apical domi-
898 nance of the hyphal tip in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
899 **24**, 1407–1418.
- 900 **SUPPORTING INFORMATION**
- 901 Additional Supporting Information may be found in the online
902 version of this article at the publisher's website.
- 903
- 904
- 905 **Fig. S1** Nucleotide sequence homology between all members
906 of the FTF (*Fusarium transcription factor*) gene family. (A) Per-
907 centages of homology between the open reading frames
908 (ORFs). (B) Percentages of homology between the 462-bp frag-
AQ18 909 ment used for silencing. The numbers in parentheses indicate
910 the type of protein deduced from the ORF of each locus.
- 911 **Fig. S2** Gene expression analysis of FTF2 (*Fusarium transcription*
912 *factor 2*) during growth in culture. The expression of the gene
913 FTF2 was measured by reverse transcription-quantitative polymer-
914 ase chain reaction (RT-qPCR) in mycelia grown in liquid culture
915 (potato dextrose broth, PDB). FOP-SP1 and FOP-SP4 are highly
916 virulent (HV) and weakly virulent (WV) *Fusarium oxysporum* f. sp.
917 *phaseoli* wild-types, respectively. The expression measurements
918 for each strain were referred to the arbitrary value of unity
919 obtained after 6 h of growth. Error bars indicate the standard
920 deviations obtained in three independent biological experiments.
- 921 **Fig. S3** Southern hybridization of *HindIII*-digested DNA from
922 knockout and silenced transformants of *Fusarium oxysporum*.
923 Digested DNA from knockout mutants obtained from strain
924 FOP-SP1 and the mutant complemented with the *FTF2* (*Fusarium*
925 *transcription factor 2*) wild-type allele, hybridized with
926 probe M18B-M19A (a fragment of the *FTF1* gene) (A, B).
927 Digested DNA from attenuated transformants obtained from
928 strain FOP-SP1 and hybridized with probe SilFTF2F.NcoI-
929 SilFTF2R.NcoI which includes the silencing-inducer *FTF1* frag-
930 ment (C), probe HphF-HphR which includes the hyg resistance
931 gene (D), and probes HphF-HphR and PhleoF-PhleoR, the latter
932 including the phleo resistance gene (E). Digested DNA from
933 attenuated transformants obtained from strain 4287 and hybrid-
934 ized with probe SilFTF2F.NcoI-SilFTF2R.NcoI (F) and probe
935 HphF-HphR (G). SP1 Δ FTF2.1–6 are knockout mutants obtained
936 by transformation of strain FOP-SP1; SP1 Δ FTF2-FTF2 is mutant
937 SP1 Δ FTF2.1 complemented with a wild-type *FTF2* allele; FOP-
938 SP1 and FOP-SP4 are highly virulent (HV) and weakly virulent
939 (WV) strains of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, respectively; AB82
940 is a non-pathogenic *F. oxysporum* strain; SP1FTFRNAi.2,
941 SP1FTFRNAi.4 and SP1FTFRNAi.5 are attenuated mutants
942 obtained by transformation of strain FOP-SP1 with the silencing
943 construct containing the *hph* gene; SP1FTFRNAi.16 is an atten-
944 uated mutant obtained by transformation of strain FOP-SP1
945 with the silencing construct containing the *phleo* gene;
946 SP1FTFRNAi was obtained by transformation of FOP-SP1 with
947 the backbone of the silencing construct lacking the silencing-
948 inducer fragment; 4287FTFRNAi1–5 are attenuated mutants
949 obtained by transformation of strain 4287 with the silencing
950 construct containing the *hph* gene; 4287FTFRNAi was obtained
951 by transformation of 4287 with the backbone of the silencing
952 construct lacking the silencing-inducer fragment; 4287 is an
953 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 strain.
- 954 **Fig. S4** Growth in solid culture (potato dextrose agar, PDA)
955 and sporulation in liquid culture (potato dextrose broth, PDB)
956 of *FTF2* (*Fusarium transcription factor 2*) mutants (SP1 Δ FTF2.1
957 and SP1 Δ FTF2.2), an *FTF2* mutant complemented with the
958 *FTF2* wild-type allele (SP1 Δ FTF2-FTF2), *FTF* attenuated mutants
959 obtained by transformation of strain FOP-SP1 (SP1FTFRNAi.2,
960 SP1FTFRNAi.4, SP1FTFRNAi.5, SP1FTFRNAi.16 and SP1FTFRNAi)
961 or strain 4287 (4287FTFRNAi1-5 and 4287FTFRNAi), and the
962 wild-type strains FOP-SP1 and 4287. Measurements were per-
963 formed after 7 days of growth.
- 964 **Fig. S5** Southern hybridization of *HindIII*-digested DNA from
965 transformants of *Fusarium oxysporum*. The membrane was
966 hybridized with probe M18B-M19A which includes the *FTF1*
967 (*Fusarium transcription factor 1*) gene (A) and probe HphF-
968 HphR which includes the *hph* gene (B). FOP-SP4 is a weakly
969 virulent (WV) wild-type strain; SP4FTF1.1 and SP4FTF1.2 are
970 strains derived from FOP-SP4 by transformation with a plasmid
971 containing the native *FTF1* gene, and contain one copy and
972 three copies, respectively, of *FTF1*. Size markers (kb) are indi-
973 cated on the left.

974 **Fig. S6** Fusarium wilt induced in common bean plants by *Fusar-*
975 *ium oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains expressing the *FTF1* (*Fusar-*
976 *ium transcription factor 1*) gene. Disease symptoms were
977 measured according to the Center for Tropical Agriculture (CIAT)
978 scale in plants inoculated with transformant strains (SP4*FTF1.1*
979 and SP4*FTF1.2*) harbouring copies of the native *FTF1* gene (A) or
980 with transformants harbouring the *FTF1* open reading frame (ORF)
981 constitutively expressed by the *gpdA* promoter (SP4*PgpdA*:
990

FTF1.1–6) (B). All the transformants were derived from the weakly 982
virulent (WV) FOP-SP4 strain. (C) Semi-quantitative reverse 983
transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out 984
using RNA extracted from plant hypocotyls at 14 days post- 985
inoculation (dpi). FOP-SP1 is a highly virulent (HV) strain. 986

Table S1 Growth and sporulation of wild-types, knockout and 987
attenuated transformants of *Fusarium oxysporum*. 988

Table S2 Oligonucleotides used in this study. 989

WILEY
Author Proof

FOXG_09390 (FTF2)

FOQG_15325 (A)	84.1	FOQG_15325 (A)
FOTG_16755 (A)	84.0 98.7	FOTG_16755 (A)
FOXG_14422 (A)	84.0 98.7 99.7	FOXG_14422 (A)
FOXG_15059 (A)	84.0 98.7 99.7 100	FOXG_15059 (A)
FOTG_18080 (A)	82.2 93.8 93.4 93.5 93.5	FOTG_18080 (A)
FOIG_16560 (A)	81.4 89.2 88.9 89.0 89.0 88.1	FOIG_16560 (A)
FOMG_18985 (A)	81.6 93.3 93.0 93.1 93.1 92.3 88.3	FOMG_18985 (A)
FOTG_17879 (A)	81.8 93.4 93.2 93.2 93.2 93.2 88.3 93.3	FOTG_17879 (A)
FOIG_16484 (B)	81.8 94.0 93.7 93.7 93.7 92.7 89.3 92.3 92.8	FOIG_16484 (B)
FOQG_19052 (B)	81.1 93.1 92.7 92.7 92.7 92.4 88.3 91.7 91.4 92.4	FOQG_19052 (B)
FOMG_18692 (B)	81.5 94.2 93.8 93.8 93.8 93.1 89.4 92.6 92.4 93.1 93.4	FOMG_18692 (B)
FOTG_17956 (B)	81.5 94.2 93.7 93.7 93.7 93.1 89.4 92.4 92.2 93.1 93.3 98.5	FOTG_17956 (B)
FOMG_18999 (C)	81.0 92.8 92.4 92.5 92.5 92.2 88.4 91.1 91.2 91.8 91.5 95.3 95.6	FOMG_18999 (C)
FOWG_17814 (C)	81.4 94.0 93.5 93.6 93.6 94.1 90.0 93.0 92.9 93.9 93.1 94.2 94.3 92.8 100	FOWG_17814 (C)
FOXG_17123 (C)	81.4 94.0 93.5 93.6 93.6 94.1 90.0 93.0 92.9 93.9 93.1 94.2 94.3 92.8 100	FOXG_17123 (C)
FOWG_17740 (C)	81.2 92.7 92.4 92.5 92.5 92.6 89.4 91.5 91.6 92.6 92.1 93.1 93.1 92.0 94.5 94.5	FOWG_17740 (C)
FOXG_16414 (C)	81.3 92.8 92.5 92.5 92.5 92.7 89.4 91.6 91.7 92.7 92.0 93.1 93.2 92.0 94.6 94.6 99.9	FOXG_16414 (C)
FOXG_17084 (C)	80.9 92.5 92.2 92.2 92.2 92.6 89.0 91.9 91.6 92.3 91.8 92.8 92.9 91.6 94.5 94.5 93.2 93.2	FOXG_17084 (C)
FOXG_14000 (C)	80.9 92.5 92.2 92.2 92.2 92.6 89.0 91.9 91.6 92.3 91.8 92.8 92.9 91.6 94.5 94.5 93.2 93.2 100	FOXG_14000 (C)
FOXG_12589 (C)	80.9 92.5 92.2 92.2 92.2 92.6 89.0 91.9 91.6 92.3 91.8 92.8 92.9 91.6 94.5 94.5 93.2 93.2 100 100	FOXG_12589 (C)
FOWG_17908 (C)	80.9 92.5 92.2 92.2 92.2 92.6 89.0 91.9 91.6 92.3 91.8 92.8 92.9 91.6 94.5 94.5 93.2 93.2 100 100	FOWG_17908 (C)
FOXG_12539 (C)	80.9 92.5 92.2 92.2 92.2 92.6 89.0 91.9 91.6 92.3 91.8 92.8 92.9 91.6 94.5 94.5 93.2 93.2 100 100 100	FOXG_12539 (C)
FOWG_18009 (A)	81.5 93.2 92.9 92.9 92.9 93.3 87.7 91.6 91.9 92.6 92.2 93.0 92.8 91.8 94.6 94.6 93.5 93.5 93.4 93.4 93.4 93.4	FOWG_18009 (A)
FOXG_17458 (A)	81.5 93.2 92.9 92.9 92.9 93.4 87.8 91.7 92.0 92.6 92.2 93.0 92.8 91.8 94.6 94.6 93.4 93.4 93.4 93.4 93.4 93.4	FOXG_17458 (A)
FOIG_16630 (B)	81.5 92.8 92.3 92.3 92.3 91.8 88.5 91.3 91.3 91.8 91.4 92.9 92.8 91.4 93.3 93.3 91.9 92.0 91.9 91.9 91.9 91.9 91.8 91.7	FOIG_16630 (B)
FOXG_14257 (A)	82.7 93.5 93.2 93.1 93.1 92.9 87.5 91.6 91.8 92.4 91.7 92.9 92.8 91.7 93.5 93.5 92.3 92.3 92.1 92.1 92.1 92.1 92.1 92.7 92.6 96.4	FOXG_14257 (A)
FOWG_17325 (A)	82.7 93.5 93.2 93.1 93.1 92.9 87.5 91.6 91.8 92.4 91.7 92.9 92.8 91.7 93.5 93.5 92.3 92.3 92.1 92.1 92.1 92.1 92.1 92.7 92.6 96.4 100	FOWG_17325 (A)

A

FOXG_09390 (FTF2)

FOQG_15325 (A)	85.5	FOQG_15325 (A)
FOTG_16755 (A)	85.5 99.6	FOTG_16755 (A)
FOXG_14422 (A)	85.7 99.8 99.8	FOXG_14422 (A)
FOXG_15059 (A)	85.7 99.8 99.8 100	FOXG_15059 (A)
FOTG_18080 (A)	84.2 94.4 94.4 94.6 94.6	FOTG_18080 (A)
FOIG_16560 (A)	83.9 93.7 93.7 93.9 93.9 92.4	FOIG_16560 (A)
FOMG_18985 (A)	83.3 94.4 94.4 94.6 94.6 93.1 93.1	FOMG_18985 (A)
FOTG_17879 (A)	85.0 92.6 92.6 92.8 92.8 90.9 90.2 92.2	FOTG_17879 (A)
FOIG_16484 (B)	84.8 96.1 96.1 96.3 96.3 93.3 93.7 93.5 92.2	FOIG_16484 (B)
FOQG_19052 (B)	84.2 94.8 94.8 95.0 95.0 94.8 92.4 93.1 91.5 93.5	FOQG_19052 (B)
FOMG_18692 (B)	83.7 93.9 93.9 94.1 94.1 92.8 92.2 92.6 91.1 93.1 93.1	FOMG_18692 (B)
FOTG_17956 (B)	83.9 94.6 94.6 94.8 94.8 93.5 92.8 93.3 91.8 93.7 93.7 98.9	FOTG_17956 (B)
FOMG_18999 (C)	83.1 93.7 93.7 93.9 93.9 92.6 92.0 92.4 91.3 92.8 92.8 99.3 98.7	FOMG_18999 (C)
FOWG_17814 (C)	82.9 93.9 93.9 94.1 94.1 93.7 92.2 92.8 90.2 93.5 93.7 92.6 93.7 92.4	FOWG_17814 (C)
FOXG_17123 (C)	82.9 93.9 93.9 94.1 94.1 93.7 92.2 92.8 90.2 93.5 93.7 92.6 93.7 92.4 100	FOXG_17123 (C)
FOWG_17740 (C)	83.1 94.6 94.6 94.8 94.8 94.1 93.1 92.8 90.2 92.8 94.6 93.5 93.9 93.3 94.4 94.4	FOWG_17740 (C)
FOXG_16414 (C)	83.7 94.8 94.8 95.0 95.0 94.8 93.3 93.5 90.9 93.5 94.4 93.7 94.1 93.5 95.0 95.0 99.3	FOXG_16414 (C)
FOXG_17084 (C)	83.1 94.4 94.4 94.6 94.6 93.9 92.4 93.3 90.5 93.1 94.4 93.3 93.9 93.1 94.6 94.6 95.0 94.8	FOXG_17084 (C)
FOXG_14000 (C)	83.1 94.4 94.4 94.6 94.6 93.9 92.4 93.3 90.5 93.1 94.4 93.3 93.9 93.1 94.6 94.6 95.0 94.8 100	FOXG_14000 (C)
FOXG_12589 (C)	83.1 94.4 94.4 94.6 94.6 93.9 92.4 93.3 90.5 93.1 94.4 93.3 93.9 93.1 94.6 94.6 95.0 94.8 100 100	FOXG_12589 (C)
FOWG_17908 (C)	83.1 94.4 94.4 94.6 94.6 93.9 92.4 93.3 90.5 93.1 94.4 93.3 93.9 93.1 94.6 94.6 95.0 94.8 100 100 100	FOWG_17908 (C)
FOXG_12539 (C)	83.1 94.4 94.4 94.6 94.6 93.9 92.4 93.3 90.5 93.1 94.4 93.3 93.9 93.1 94.6 94.6 95.0 94.8 100 100 100	FOXG_12539 (C)
FOWG_18009 (A)	83.1 94.6 94.6 94. 94.8 94.1 92.6 92.8 90.7 92.8 94.6 92.2 92.8 92.0 93.5 93.5 94.8 94.6 94.1 94.1 94.1 94.1 94.1	FOWG_18009 (A)
FOXG_17458 (A)	83.1 94.8 94.8 95.0 94.0 94.4 93.8 93.1 90.9 93.1 94.8 92.4 93.1 92.2 93.3 93.3 94.6 94.4 93.9 93.9 93.9 93.9 93.9 99.8	FOXG_17458 (A)
FOIG_16630 (B)	86.3 89.6 89.6 89.8 89.8 89.2 88.3 88.7 88.1 88.7 88.9 88.9 89.6 88.7 89.2 89.2 89.2 89.4 89.8 89.8 89.8 89.8 89.8 88.7 88.7	FOIG_16630 (B)
FOXG_14257 (A)	86.3 89.6 89.6 89.8 89.8 89.2 88.7 88.9 88.1 89.2 89.4 89.8 90.5 89.6 89.6 89.6 89.2 89.4 90.2 90.2 90.2 90.2 90.2 88.7 88.7 96.1	FOXG_14257 (A)
FOWG_17325 (A)	86.3 89.6 89.6 89.8 89.8 89.2 98.7 88.9 88.1 89.2 89.4 89.8 90.5 89.6 89.6 89.6 89.2 89.4 90.2 90.2 90.2 90.2 90.2 88.7 88.7 96.1 100	FOWG_17325 (A)

B

Fig. S1. Nucleotide sequence homology between all the members of the *FTF* gene family. (A) Percentages of homology between the ORFs. (B) Percentages of homology between the 462 bp fragment used for silencing. The numbers in parenthesis indicate the type of protein deduced from the ORF of each locus.

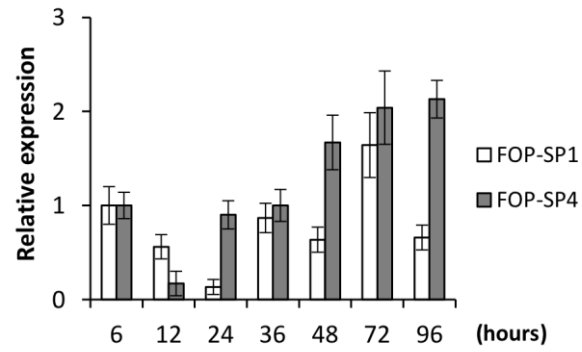


Fig. S2. Gene expression analysis of *FTF2* during in culture growth. The expression of the gene *FTF2* was measured by RT-qPCR in micelia grown in liquid culture (PDB). FOP-SP1 and FOPSP4 are HV and WV, respectively, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* wild types. The expression measurements for each strain were referred to the arbitrary value 1 obtained after 6 h of growth. Error bars indicate the standard deviations obtained in three independent biological experiments.

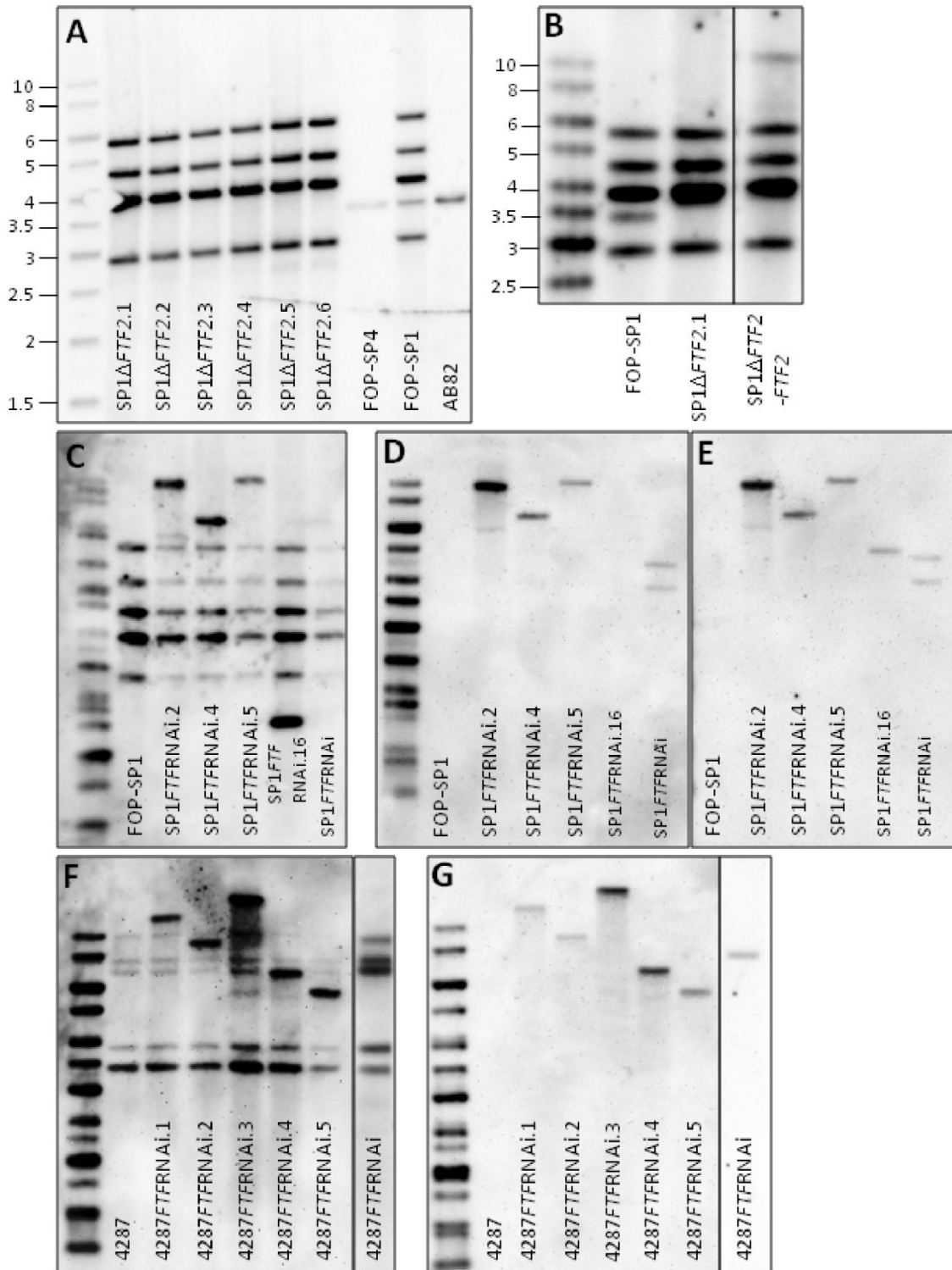


Fig. S3. Southern hybridization of *Hind*III digested DNA from knock-out and silenced transformants of *F. oxysporum*. Digested DNA from knock-out mutants obtained from strain FOP-SP1 and the mutant complemented with the *FTF2* wild type allele, hybridized with probe M18B-M19A (a fragment of the *FTF1* gene) (A and B). Digested DNA from attenuated transformants obtained from strain FOP-SP1 and hybridized with probe SiIFTF2F.NcoI-SiIFTF2R.NcoI which includes the silencing-inducer *FTF1* fragment (C), probe HphF-HphR which includes the hyg resistance gene (D), and probes HphF-HphR and PhleoF-PhleoR, the later including the phleo resistance gene (E). Digested DNA from attenuated transformants obtained from strain 4287 and hybridized with probe SiIFTF2F.NcoI-SiIFTF2R.NcoI (F) and probe HphF-HphR (G). SP1ΔFTF2.1-6 are knock-out

mutants obtained by transformation of strain FOP-SP1; SP1 Δ FTF2-FTF2 is mutant SP1 Δ FTF2.1 complemented with a wild type *FTF2* allele; FOP-SP1 and FOP-SP4 are HV and WV strains, respectively, of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*; AB82 is a non-pathogenic *F. oxysporum* strain; SP1FTFRNAi.2, SP1FTFRNAi.4 and SP1FTFRNAi.5 are attenuated mutants obtained by transformation of strain FOP-SP1 with the silencing construction containing the *hph* gene; SP1FTFRNAi.16 is an attenuated mutant obtained by transformation of strain FOP-SP1 with the silencing construction containing the *phleo* gene; SP1FTFRNAi was obtained by transformation of FOP-SP1 with the backbone of the silencing construction lacking the silencing-inducer fragment; 4287FTFRNAi1-5 are attenuated mutants obtained by transformation of strain 4287 with the silencing construction containing the *hph* gene; 4287FTFRNAi was obtained by transformation of 4287 with the backbone of the silencing construction lacking the silencing-inducer fragment; 4287 is a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 strain.

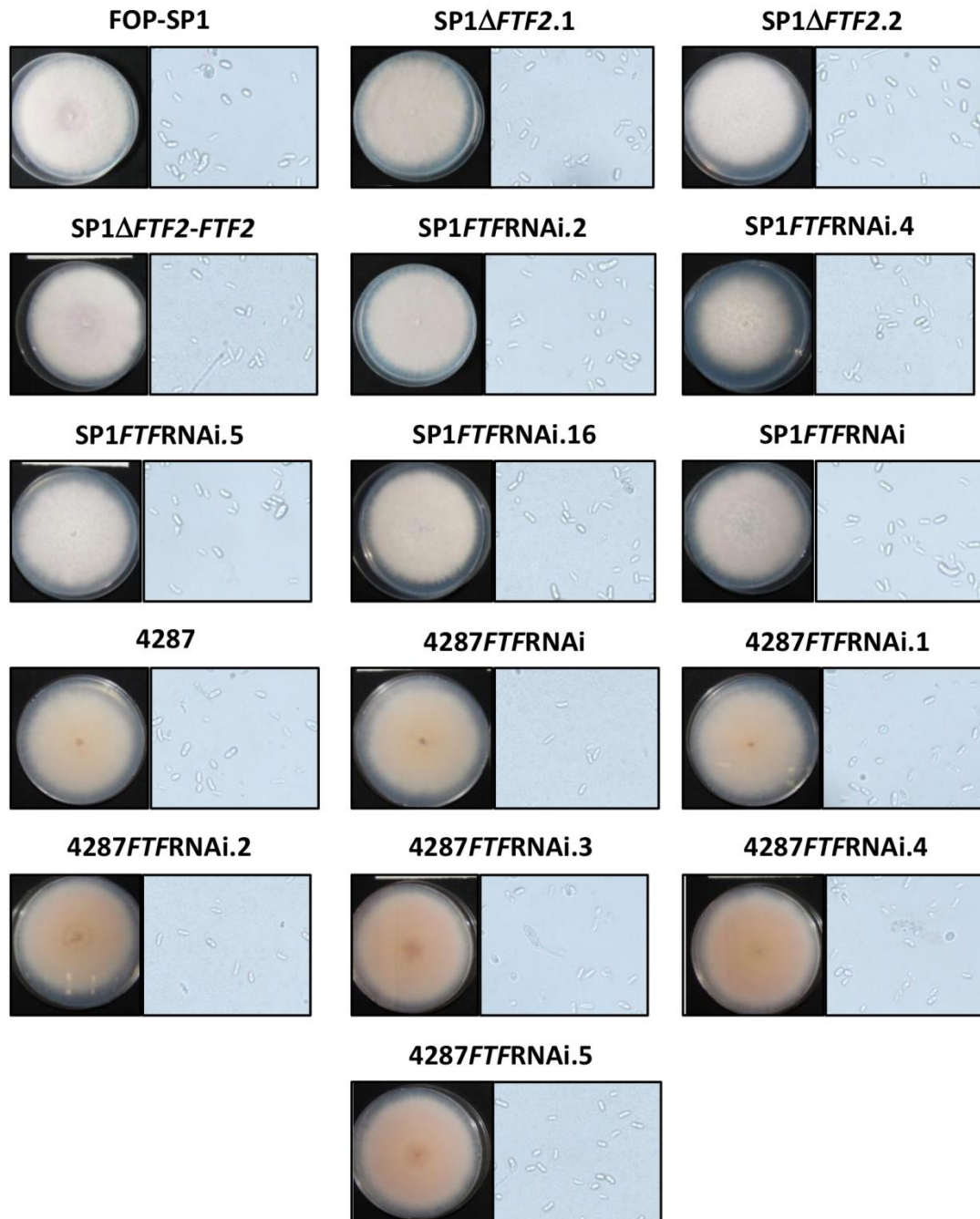


Fig. S4. Growth in solid culture (PDA) and sporulation in liquid culture (PDB) of *FTF2* mutants (*SP1ΔFTF2.1* and *SP1ΔFTF2.2*), an *FTF2* mutant complemented with the *FTF2* wild type allele (*SP1ΔFTF2-FTF2*), *FTF* attenuated mutants obtained by transformation of strain FOP-SP1 (*SP1FTFRNAi.2*, *SP1FTFRNAi.4*, *SP1FTFRNAi.5*, *SP1FTFRNAi.16* and *SP1FTFRNAi*) or strain 4287 (*4287FTFRNAi.1-5* and *4287FTFRNAi*), and the wild type strains FOP-SP1 and 4287. Measurements were performed after 7 days of growth.

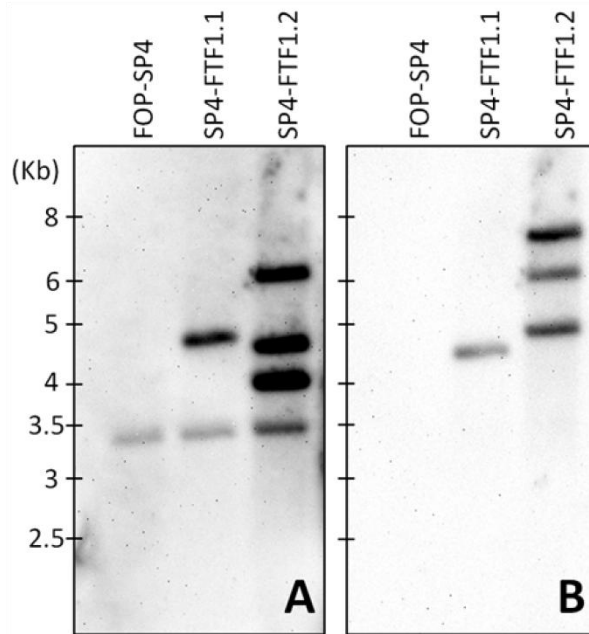


Fig. S5. Southern hybridization of *Hind*III digested DNA from transformants of *F. oxysporum*. The membrane was hybridized with probe M18B-M19A which includes the *FTF1* gene (A) and probe HphF-HphR which includes the *hph* gene (B). FOP-SP4 is a WV wild type strain; SP4*FTF1.1* and SP4*FTF1.2* are strains derived from FOP-SP4 by transformation with a plasmid containing the native *FTF1* gene, and contain one copy and three copies, respectively, of *FTF1*. Size markers (Kb) are indicated on the left.

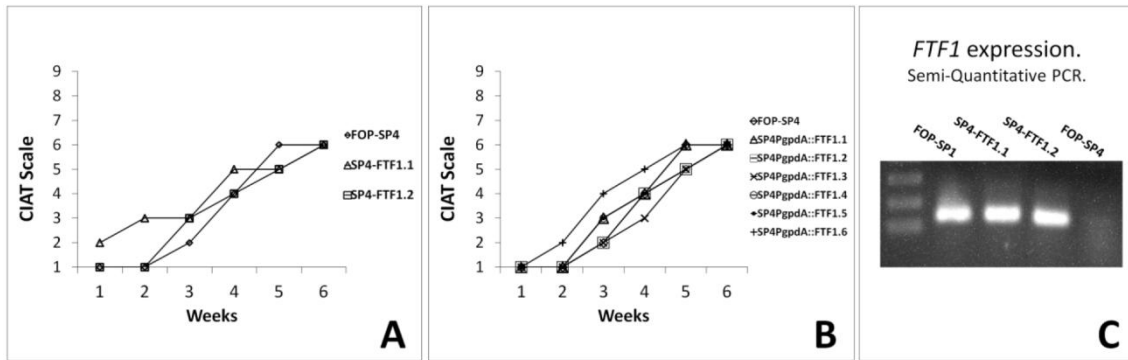


Fig. S6. Fusarium wilt induced in common bean plants by *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* strains expressing the *FTF1* gene. Disease symptoms were measured according to the CIAT scale in plants inoculated with transformants strains (SP4*FTF1.1* and SP4*FTF1.2*) harboring copies of the native *FTF1* gene (A) or with transformants harboring the *FTF1* ORF constitutively expressed by the *gpdA* promoter (SP4*PgpdA::FTF1.1* to 6) (B). All the transformants were derived from the WV FOP-SP4 strain. (C) Semiquantitative RT-PCR was carried out using RNA extracted from plant hypocotyls at 14 dpi. FOP-SP1 is a HV strain.

Table S1. Growth and sporulation of wild types, knock-out and attenuated transformants of *F. oxysporum*.

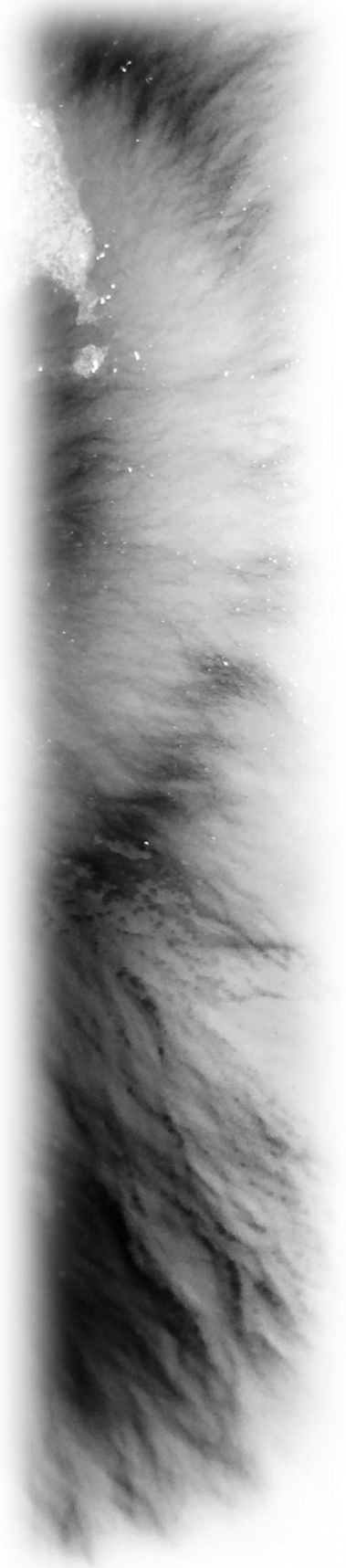
Strain	Growth (mm)	Sporulation (%)
FOP-SP1	71.4 ± 2.7	8.0 × 10 ⁷ /mL* 100.0% ± 8.7
SP1ΔFTF2.1	69.7 ± 1.3	107.2% ± 12.2
SP1ΔFTF2.2	68.8 ± 1.4	108.0% ± 6.7
SP1ΔFTF2-FTF2	69.6 ± 1.0	94.4% ± 7.1
SP1FTFRNAi	68.4 ± 1.8	94.2% ± 6.4
SP1FTFRNAi.2	73.0 ± 3.2	103.4% ± 4.5
SP1FTFRNAi.4	73.1 ± 2.6	104.2% ± 6.1
SP1FTFRNAi.5	69.9 ± 2.5	91.8% ± 5.2
SP1FTFRNAi.16	72.3 ± 2.9	96.6% ± 3.0
4287	68.7 ± 2.1	7.3 × 10 ⁷ /mL* 100.0% ± 7.6
4287FTFRNAi	72.0 ± 1.4	96.9% ± 5.0
4287FTFRNAi.1	69.7 ± 0.9	107.8% ± 9.6
4287FTFRNAi.2	66.4 ± 1.0	103.7% ± 5.5
4287FTFRNAi.3	68.4 ± 0.6	104.2% ± 8.5
4287FTFRNAi.4	65.0 ± 1.9	93.4% ± 8.4
4287FTFRNAi.5	67.9 ± 1.7	105.7% ± 8.4

* The concentration of spores per mL obtained in cultures of the wild types FOP-SP1 and 4287 was used as 100% sporulation for normalization of the concentrations measured in mutants.

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides	Accession No. or plasmid	Oligonucleotides sequence	Amplicon size (bp)
B285	DQ280313 ^a	ATCGTCACTACGCCGTCCG	300
A5		TGGGTGTGATCTAGTAGGGAAACG	
B310User	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTC	4890
M40AUser		GGACTTAAUCTGGGTATGGATGAGTTGGCGAC	
FTF1UserF	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCTAATGACCCTGTTGCTGTA	3290
FTF1UserR		GGACTTAAUGATGTCCGGCCATGCCG	
InacFTF2-O1	FOXG_09390 ^b	GGTCTTAAUGACAGCGACAACCCAAGCCAAAC	844
InacFTF2-O2		GGCATTAAUCCCTGCCCTGCGAGAGAGACAAG	
InacFTF2-A3	FOXG_09390 ^b	GGACTTAAUATGAAGCCAACAGCGGAAGCC	776
InacFTF2-A4		GGGTTTAAUATATCCTGACCACCACCCAACCC	
PhleoF-Apal	pJL43-RNAI ^d	GGGCCCCCCCTCGAGGTCGACTCTAG	1492
PhleoR-Scal		AGTACTGATATCAAGCTTGCAAATTAAGCCTTC	
PromFTF2User-F	FOXG_09390 ^b	GGACTTAAUCTTGTCTCTCTCGCAGGGCAGG	4717
TerFTF2User-R		GGGTTTAAUAGCGGAGGAATAGAAGGGTGTGG	
RNAi-U1	pJL43-RNAI ^d	GGGTTTAAUCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG	3406
RNAi-U4		GGTCTTAAUGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT	
SiFTF2F-NcoI	FOXG_09390 ^b	CCATGGGGACGGATCATCACCTACCTGAGCC	462
SiFTF2R-NcoI		CCATGGCGTGTGGCTTCATGTTGGGATT	
RNAi-User1	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAA	2308
RNAi-User2		GGACTTAAUGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT	
FTF1-F	DQ280313 ^a	TGTGGTGGCCAGGATATGATG	110
FTF1-R		TGCATGCCTGCCTTGACAT	
FTF2-F	FOXG_09390 ^b	ATGCTCACACCCCCACATTCT	108
FTF2-R		ATCCCCCAAAGACAAGCTGAC	
SGE1-F	FOXG_10510 ^b	CAGCCGTATCCTTGGAACCTA	101
SGE1-R		TGGTTGACTTGCCGTTCCCTT	
SIX1-F	AJ608702 ^a	GAGCCGCCTCAATCGCCTG	194
SIX1-R		GCCCAAGTTGCGCGATATGTG	
SIX6-F	ACY39286.1 ^a	GCTTTTTCGTTGGCGAACCC	102
SIX6-R		TTTTCCCGTTGCTGAGATTGCG	
EF1alpha-F	FOXG_03515 ^b	CATCGGCCACGTCGACTCT	144
EF1alpha-R		AGAACCCAGGCGTACTTGAA	
Actin-F	Phvul.011G064500 ^c	GAAGTTCTCTTCCAACCATCC	175
Actin-R		TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	
GS-F	FOXG_05182 ^b	TGCCAAGGGCTATGGCTACT	97
GS-R		CACGGTAAGGGTCAGCGTTAG	
M18B	DQ280313 ^a	CGCCAAAACGCAAGCTCAACTTC	689
M19A		GCGAGGGGTGCCGAAACAAAGC	
Hph-F	pRF-HU ^d	GCGCTTCTGCGGGCGATTTG	549
Hph-R		CGGGTTCGGCCCATTCGGAC	
PhleoF	pJL43-RNAI ^d	CCAAGTTGACCAGTGCCGTTCC	291
PhleoR		CGCCGATCTCGGTCATGGC	

(^a)GeneBank accession no., (^b) loci numbers of the genome of *F. oxysporum* strain 4287, (^c) locus number of the *P. vulgaris* genome, (^d) plasmids



-Resumen-

1. Objetivos de la investigación

Entre las familias génicas en expansión en la región *LS*, *Lineage-Specific genomic region*, del genoma de *F. oxysporum* cabe destacar *FTF1*, gen que codifica un factor de transcripción que contiene un dominio de tipo $Zn(II)_2Cys_6$ exclusivo de hongos. *FTF1* fue primeramente descrito en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* como parte de un SCAR diseñado para la detección de estirpes muy virulentas en la planta (Alves-Santos *et al.*, 2002b; Ramos *et al.*, 2007). Existe una relación entre el número de copias de *FTF1* en las distintas estirpes de la forma especial *phaseoli* con el grado de virulencia que muestran éstas (de Vega-Bartol *et al.*, 2011).

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es analizar la función que desempeña la familia génica *FTF*, en concreto el factor de transcripción *FTF1*, sobre la virulencia, así como conocer qué genes están sometidos a su regulación.

2. Metodología

Debido al alto número de copias de *FTF1* en los genomas de *F. oxysporum*, decidimos recurrir a la atenuación de la expresión del gen mediante silenciamiento génico como estrategia alternativa al reemplazamiento génico con el fin de obtener mutantes alterados en la función. La producción de ARN bicatenario en los transformantes se produjo mediante la inserción en el genoma de un fragmento de ADN codificante de *FTF1* flanqueado por dos promotores de control constitutivo en orientaciones opuestas, tal y como se describe en Ullán y colaboradores (2008). El silenciamiento génico constituye una técnica novedosa para estudios de transcriptómica en el complejo de especies *F. oxysporum*.

3. Resultados

Los análisis bioinformáticos indican que la familia génica *FTF* en *F. oxysporum* se compone de dos genes: *FTF1* y *FTF2*. *FTF2* es un gen muy conservado (>99.7%) en el genoma de todas las formas especiales estudiadas de *F. oxysporum*. Además, está presente en todos los genomas de los ascomicetos filamentosos analizados del subfilum Pezizomycotina, y ausente en los genomas de levaduras, basidiomicetos, zigomicetos y quitridiomycetos. El gen *FTF1*, en cambio, es exclusivo del complejo de especies *F. oxysporum*. A diferencia de *FTF2*, el gen *FTF1* se encuentra localizado en regiones *LS* del genoma y muestra variabilidad respecto del número de copias según la estirpe. Dependiendo de la longitud de la secuencia nucleotídica presuntamente transcrita se puede clasificar en 3 clases: *FTF1a*, *FTF1b* y *FTF1c*.

Para el estudio funcional del papel de la familia génica *FTF* sobre la virulencia fue preciso, en primer término, estudiar la funcionalidad del gen *FTF2*. Para ello se procedió a la interrupción génica de este gen en la estirpe muy virulenta FOP-SP1 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Los transformantes analizados mostraron una disminución leve en su virulencia sobre el hospedador *Phaseolus vulgaris* en comparación con la estirpe silvestre.

A continuación, y ante la imposibilidad práctica de realizar interrupciones génicas en todas las copias parálogas de *FTF1*, se generaron transformantes silenciados en la expresión de la familia génica *FTF* en la estirpe FOP-SP1 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* y en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El primer resultado significativo obtenido del análisis de estos transformantes es que el silenciamiento génico es efectivo en el complejo de especies *F. oxysporum*, siendo la atenuación de la expresión de los genes *FTF* mayor en la forma especial *phaseoli* que en la forma especial *lycopersici*. Los transformantes que expresaban mayor reducción en la expresión de *FTF1* en ambas estirpes mostraron una drástica reducción de la virulencia sobre el hospedador. La comparación de la reducción en virulencia obtenida en los mutantes alterados en *FTF2* y en aquellos atenuados en la expresión de toda la familia *FTF*, evidencia que el papel de los parálogos de *FTF1* en la gravedad de síntomas ocasionados en las plantas infectadas es superior al de la copia de *FTF2*.

Sin embargo, la expresión de *FTF1* en la estirpe poco virulenta FOP-SP4 de la forma especial *phaseoli* no es suficiente para incrementar la virulencia de esta estirpe. Este dato es el resultado de los ensayos de infección realizados con transformantes de la estirpe poco virulenta FOP-SP4 que expresaban la copia de *FTF1* en la forma especial *phaseoli*, denominada *phas14257*, homóloga a *FOXG_14257* de la estirpe 4287. Los transformantes correspondientes, tanto con la copia de *FTF1* expresada de forma constitutiva, como la inducida por el propio promotor nativo de este gen, no mostraron un incremento de virulencia respecto de la estirpe silvestre FOP-SP4.

Los experimentos llevados a cabo para conocer el papel regulador de *FTF1* indican que este factor de transcripción está implicado en la regulación positiva de factores de virulencia, como son los efectores *SIX1* y *SIX6*. Por una parte, las estirpes de las formas especiales *phaseoli* y *lycopersici*, atenuadas en la expresión de la familia génica *FTF*, mostraron una reducción en la expresión de los genes codificadores de los efectores *SIX1* y *SIX6*, así como del gen codificador del regulador *SGE1* en la forma especial *phaseoli*. Por otra parte, los transformantes de expresión constitutiva de la copia *phas14257* de *FTF1* en FOP-SP1 incrementaron la expresión de los genes *SIX1*, *SIX6* y *SGE1* en cultivos *in vitro*, lo que refuerza el papel de *FTF1* como regulador positivo de factores claves en la virulencia de *F. oxysporum*.

El análisis de imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal en la interacción *P. vulgaris* con *F. oxysporum* mostró que los transformantes atenuados en la expresión de los genes *FTF* colonizaban en menor proporción los haces xilemáticos que la zona parenquimática en comparación con la estirpe silvestre muy virulenta FOP-SP1, de la que procedían (31,59% frente a 81,06%); asemejándose más a la colonización efectuada por una estirpe poco virulenta como FOP-SP4, cuya proporción de crecimiento en haces xilemáticos es del 11,39%.

4. Conclusiones finales

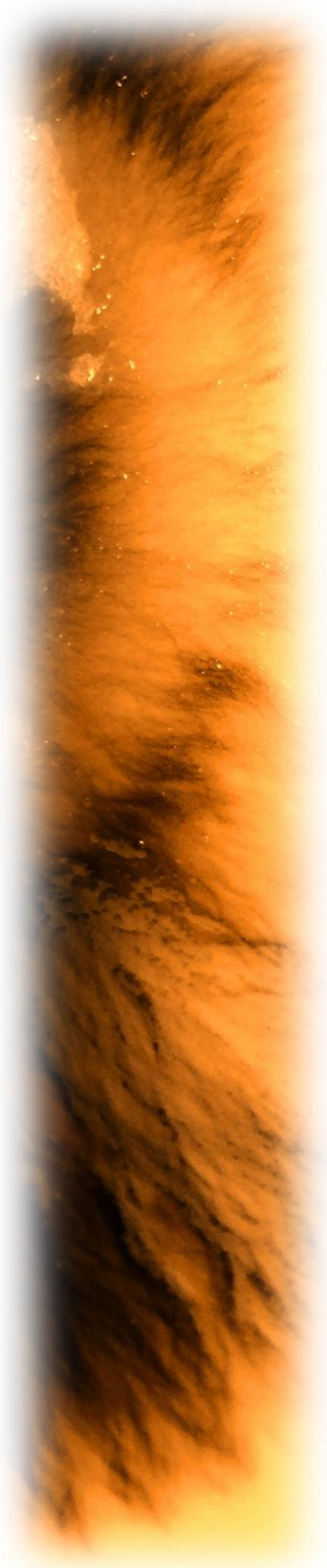
1. La familia génica *FTF* (*Fusarium Transcriptor Factor*) se compone de dos genes: *FTF1* y *FTF2*. *FTF2* es un gen bien conservado en copia única en los genomas de hongos ascomicetos filamentosos del subfílum Pezizomycotina. *FTF1* es exclusivo de estirpes muy virulentas del complejo de especies *F. oxysporum*, presente en un número variable de copias alojadas en regiones *LS* (*Lineage Specific*) del genoma. El número variable de parálogos de *FTF1* se puede clasificar en 3 clases atendiendo a las características estructurales de las presuntas proteínas codificadas: *FTF1a*, *FTF1b* y *FTF1c*.

2. Se ha optimizado un método de silenciamiento génico altamente efectivo en *F. oxysporum*, sobre todo en las estirpes de la forma especial *phaseoli*. Este método se basa en la producción de ARNs bicatenarios, inductores de silenciamiento, transcritos a partir de dos promotores que flanquean, en orientaciones opuestas, al fragmento del gen cuya expresión se pretende atenuar.

3. Los transformantes silenciados en la familia génica *FTF* en las estirpes FOP-SP1 y 4287 presentan una acusada reducción de la virulencia sobre *P. vulgaris* y *S. lycopersicum*, respectivamente. Sin embargo, tanto la expresión constitutiva como la expresión inducida por el promotor nativo del gen *FTF1* en la estirpe poco virulenta FOP-SP4, no modifican la virulencia de esta estirpe.

4. El factor de transcripción *FTF1* es un regulador directo o indirecto de los genes efectores *SIX* (*Secreted in Xylem*) *SIX1* y *SIX6*, y del gen regulador *SGE1* (*Six Gene Expression 1*). La expresión constitutiva de *FTF1* en la estirpe FOP-SP1 incrementa la expresión de *SIX1*, *SIX6* y *SGE1*; mientras que el silenciamiento de la familia génica *FTF* en las estirpes FOP-SP1 y 4287 reduce la expresión de los genes *SIX1* y *SIX6*, en ambas formas especiales, y del gen *SGE1* en la forma especial *phaseoli*.

5. Los transformantes de la estirpe muy virulenta FOP-SP1 silenciados en la familia génica *FTF* muestran un patrón de colonización de *P. vulgaris* semejante al producido por las estirpes poco virulentas.



*-Tercera
publicación-*

Quantitative PCR Analysis of Double-Stranded RNA-Mediated Gene Silencing in Fungi

22

José J. de Vega-Bartol, Vega Tello, Jonathan Niño, Virginia Casado, and José M. Díaz-Mínguez

Abstract

Gene silencing in fungi produces a range of phenotypes based on the different amounts of target mRNA that are degraded by the RNAi machinery in each transformed strain. Detection of this range of variation when analyzing groups of transformants requires a fast and sensitive method. Quantitative or real-time PCR of reverse-transcribed target mRNA is particularly well suited for this analysis.

Keywords

Silencing • Transformation • Quantitative polymerase chain reaction • Reverse transcription • PCR amplification

Introduction

Since its discovery in *Caenorhabditis elegans* [1], dsRNA-mediated or RNAi silencing has been widely used in many organisms, including fungi, for gene functional analysis [2]. A main feature of RNAi in fungi is the range of phenotypes that can be observed in silenced or *knock-down* transformants [3–5] as a consequence of the variable reduction in the amount of target RNA. The transcript abundance has to be quantified to demonstrate that gene silencing is the underlying

mechanism leading to the phenotypic effect. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the method of choice for the expression analysis of a limited number of different samples. Among its advantages are the low template input required, due to the high sensitivity of the method, and the high resolution, as small differences in expression between different transformants and the control can be measured. In addition, it is less time-consuming and cumbersome than other methods, such as Northern analysis, and the cost per sample is relatively low.

RT-qPCR is a combination of two steps: (1) reverse transcription from RNA to cDNA, followed by (2) PCR amplification of the cDNA and quantification of the amplification products in real time. There are different commercially available procedures to obtain a fluorescent signal from the synthesis of product that could be measured by real-time PCR instruments [6].

J.J. de Vega-Bartol • V. Tello • J. Niño • V. Casado • J.M. Díaz-Mínguez (✉)
Department of Microbiología y Genética-CIALE,
Universidad de Salamanca, C/Río Duero, 12, Campus de
Villamayor, Villamayor, Salamanca, 37185, Spain
e-mail: josediaz@usal.es

Quantitative detection of cDNA transcribed from the RNA template involved in gene silencing can be obtained using a fluorescent nucleic acid dye as *SYBR Green* or *EvaGreen*, which undergo a conformational change after binding to double-stranded DNA that results in an increase in fluorescence.

Individual qPCR reactions are characterized by the PCR cycle at which fluorescence, which is proportional to the amount of DNA produced in each PCR cycle, rises above a defined threshold, a parameter known as the threshold cycle (C_t) or crossing point (C_p). The more the target there is in the starting material, the lower the C_t . Measured variation is caused by both true biological variation and technical factors resulting in non-specific variation [6, 7]. Therefore, C_t values must be normalized against the initial concentration in each sample to correct for variability associated with the various steps of the experimental procedure, such as differences in the template input quantity and quality, yields of the extraction process and enzymatic reactions, and differences in the overall transcriptional activity of the cells analyzed. Once the C_t is measured there are two methods to quantify the amount of target DNA: the absolute quantification method calculates the amount of target DNA in the reaction by interpolation in a calibration curve that relates C_t to known amounts of template DNA; the relative quantification method compares the C_t of the target DNA with that of an endogenous control, which should be cDNA obtained from a steadily transcribed gene. Absolute quantification is required when a precise determination of the amount of amplicon is desired, for example for the calculation of fungal biomass in a host, but relative quantification is simpler and informative enough to characterize expression of silenced genes in fungi. Among the several normalization methods proposed [8], the use of expression of reference genes is currently preferred, because they are internal controls that are affected by all sources of variation during the experimental workflow in the same way as the genes of interest. However, a major problem is that silencing may produce unexpected alterations of important pathways involving down or upregulation of commonly used endogenous

genes. Therefore, the assessment of the expression stability of the gene(s) to be used as internal controls, under the experimental conditions employed, prior to its use for normalization is of paramount importance [9]. Some authors strongly recommend using several endogenous genes in parallel [10] to avoid the problems generated by RNAi side effects in gene expression.

One of the relevant aspects to take into account when designing RT-qPCR analysis of putatively silenced genes is primer design. During RNAi the RNA-induced silencing complex (RISC) cleaves the target mRNA sequence in the region complementary to the dsRNA [11]. Complete nucleolytic degradation of the resulting fragments is not always guaranteed, which might result in variations of the measured expression depending on the primer binding positions [12]. Thus, quantification of target mRNA may lead to different results depending on the pair of primers selected.

Software tools¹ and mathematical models have been developed to improve the accuracy and precision of RT-qPCR. A *de facto* standard is the $\Delta\Delta C_t$ method [13, 14] based on a mathematical method [15] dependent on cycle threshold (C_t) values and amplification efficiencies, and lately improved to include multiple reference genes [10]. Efforts have focused on the improvement of the determination of amplification efficiency because it is a known source of errors [16], and considering a fixed efficiency value is not acceptable. PCR efficiency could be achieved by standard curves, but novel quicker methods based on regression analysis of the PCR reaction kinetics after qPCR [17] lead to reproducible efficiency values [18].

Each step of the experimental workflow should be meticulously standardized to avoid introducing undesirable variation in the results that cannot be eliminated by applying the final normalization. Reverse transcription is awkward. Comparative results demonstrate that different RNA quantification methods produce different data and it is prudent to measure all samples

¹Check www.gene-quantification.info for examples and download links.

using the same technique [19]. Absence of proteins, DNA contamination and inhibitors, and RNA integrity have to be determined. Moderately degraded RNA samples can be reliably analyzed and quantitated, as long as amplicons are kept short (<250 bp) and expression is normalized against a reference gene [20, 21]. DNA contamination within the RNA and cDNA samples can be respectively checked by the absence of amplification and the right size product after PCR amplification of a known gene containing an intron. Reverse transcription yields depend on the target, the reverse transcriptase enzyme, priming strategy, and experimental conditions. Also, the use of random primers, oligo(dT) or gene-specific primers has to be studied in each case [6]. Each approach has advantages and no strategy always works better [22, 23].

The PCR amplification step is remarkably reproducible under optimal conditions. As stated before, primer design is quite important but recent trends toward high throughput have resulted in a reduction of the need to optimize primer concentration [6]. However, optimization of primer concentration can significantly improve sensitivity. Melting curve analysis is a single step after amplification, and consists in a slow decrease of temperature that causes the melting of amplicons. The melting temperature (T_m) is characteristic of the size and nucleotide composition of the PCR product: those longer and richer in G/C content melt at higher temperatures. Melting causes a loss of fluorescence that is quantified and represented as a melting peak by calculating the first negative derivative of the fluorescence. These peaks provide the same information as DNA band visualization in an electrophoresis gel, such as the number of different amplicons obtained by reaction. However, routine visualization of RT-qPCR products in agarose gels is still recommended.

Finally, we advise reading and adhering to the recommendations proposed in the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) [24, 25], which is a set of guidelines that describes the minimum information necessary for evaluating RT-qPCR experiments and ensuring the integrity of the scientific literature.

Materials

Isolation of RNA

1. RNase-free 1.5-mL tubes and barrier tips.
2. Liquid nitrogen.
3. Mortar and pestle.
4. Commercial tri-reagent, such as Invitrogen Trizol Reagent.
5. DEPC-treated water.
6. Chloroform (trichloromethane).
7. Isopropanol (2-propanol).
8. Absolute ethanol.
9. 3 M Sodium acetate (NaOAc or CH_3COONa).
10. 1.5-mL tubes centrifuge.
11. *Speed vac* or desiccator connected to vacuum.

Determination of RNA Concentration and Quality

1. Nanodrop spectrophotometer.
2. DEPC-treated water and distilled water.
3. Agarose gel electrophoresis reagents (agarose, TAE buffer, etc.) and equipment. Check specific protocols.

DNase Treatment

1. RNase-free DNase I.
2. DNase kit buffer.
3. RNase-free water.
4. DNase inactivator.
5. 0.2-mL RNase-free tubes.
6. Thermocycler or water bath.

cDNA Synthesis

1. Random hexamers or oligo(dT)n primers.
2. RNase-free water.
3. cDNA synthesis kit buffer.
4. DTT.
5. dNTP mix.

6. Reverse transcriptase.
7. RNase activity inhibitor (*Invitrogen RNaseOUT* or *Roche Protector RNase Inhibitor*).
8. Thermocycler.

qPCR Quantification and Analysis

1. Gene-specific oligonucleotides.
2. SYBR Green reagent.
3. Molecular biology grade water.
4. RT-qPCR thermocycler.
5. Programs LinRegPCR, geNorm, and Microsoft Excel.

Methods

Reverse Transcription from RNA to cDNA

Isolation of RNA

In fungi, Tri-reagent²-based protocols generally provide a better yield than column-based methods. All the handling steps have to be done placing the tubes in ice. Use RNase-free consumables and barrier tips.

1. Grow the untransformed wild-type strain and several transformed strains in appropriate liquid medium. Previously, verify plasmid insertion into the transformant genome by PCR amplification of the promoter and a part of the target gene. Centrifuge the culture, wash the tissue (mycelia, spores, etc.) with distilled water, and centrifuge to eliminate the remaining liquid before freezing the samples under in liquid nitrogen. Samples may be stored at -80°C until processing.
2. Remove fungal samples from the -80°C freezer and grind 100 mg of mycelia with mortar and pestle. Add liquid nitrogen and grind to obtain a fine dust.

3. Place the ground material in a 1.5-mL tube and add 1 mL of Tri-reagent.
4. Repeatedly pipette to obtain a homogeneous suspension. Place the tubes on ice.
5. Add 0.2 mL of chloroform, shake gently several times and incubate for 5–10 min.
6. Centrifuge at 4°C for 15 min at $12,000\times g$, and transfer the supernatant to a fresh tube.
7. Add 0.5 mL of cold isopropanol and precipitate RNA for 10 min at room temperature.
8. Centrifuge at 4°C for 8 min at $12,000\times g$.
9. Remove the liquid phase with a micropipette, being careful not to disturb the pellet. Allow the pellet to dry for 5–10 min in a fume hood.
10. Dissolve the pellet in 0.4 mL of DEPC-treated water pipetting up and down.
11. Add 0.8 mL of cold phenol to precipitate remaining contaminations, shake by hand several times, and incubate 5–10 min in ice.
12. Centrifuge at 4°C for 15 min at $8,000\times g$ and transfer the supernatant to a fresh 1.5-mL tube.
13. Add 2.2 volumes of cold absolute ethanol and 0.1 vol of 3 M NaOAc to precipitate the nucleic acids. Incubate at -20°C (the longer the better). This is a good stopping point.
14. Centrifuge at 4°C for 20 min at $12,000\times g$.
15. Remove the remaining liquid with a micropipette, being careful not to disturb the pellet. It is not necessary to remove all of the supernatants.
16. Wash the pellet with 70% ethanol.
17. Centrifuge being careful not to disturb the pellet for 5 min at $8,000\times g$.
18. Remove the remaining liquid with a micropipette. Dry the pellet in *speed vac* for 5–10 min until dry.
19. Dissolve the RNA pellet in 50 μL of DEPC-treated water.

Determination of RNA Concentration and Quality

It is very important to assess the quality of the RNA samples and accurately measure the RNA concentration. For both purposes convenient absorbance readings may be obtained from very

²For example Invitrogen Trizol Reagent. Cat. Number: 15596-026. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/15596026>.

small volumes by using a Nanodrop spectrophotometer.

1. For an accurate measurement heat the RNA for 5–10 min at 55°C to completely resuspend it.
2. Set the Nanodrop to zero with 1 µL of distilled water. Configure the system for RNA measurements and measure 1 µL of DEPC-treated water as blank. Use 1–2 µL of each undiluted RNA sample. Clean the pedestal after measuring each sample. Measurement of blank samples between RNA samples is not needed. In nanodrop measurements, a ratio of absorbances at 260/280 nm around 2 is accepted as pure RNA. Lower values indicate the presence of proteins, phenol, or other contaminants. The ratio at 260/230 nm has to be higher than the previous 260/280 nm one for pure RNA. Values over 2.2 or less than 1.8 indicate the presence of contaminants. In agarose gels, intact RNA is observed as two bands around 2 and 4 kb corresponding to 18S and 28S ribosomal RNA, respectively. The degraded RNA appears as a lower molecular weight smear.
3. Visualize your RNA sample by agarose gel electrophoresis in 1% gels. Dilute 1 g of agarose in 100 mL of TAE or TBE buffer.³ Heat at 70°C for 10–15 min a sample containing 1 µg of RNA (Optional: mix it with 0.5 vol of formaldehyde loading dye before loading on the gel well).

DNase Treatment

DNA traces that may be present in the RNA samples should be removed by means of a DNase treatment. It is best to use a procedure that does not require phenol/chloroform extraction, heating or addition of EDTA. The quantities given allow the amplification of ten target/endogenous genes with three replicates per run (30rx).

1. Transfer a volume of sample containing 2 µg of RNA to a fresh 0.2-mL PCR tube. Add water for a final volume of 44 µL. Use the same amount of total RNA in each reaction.

³Optional: the addition of formaldehyde denatures the high secondary structure of the RNA molecule for a clear visualization.

2. Prepare a master mix with 5 µL of 10× Buffer and 1 µL of DNase per sample.
3. Add 6 µL from the master mix to each sample tube to sum up 50 µL.
4. Incubate at 37°C in a thermocycler for 30 min.
5. Add 5 µL of DNase inactivator reagent to each tube and incubate during 5 min at room temperature.
6. Centrifuge for 1.5 min at 10,000×g and room temperature. Proceed immediately with the cDNA synthesis.

cDNA Synthesis

The following information is for *Roche Transcription High Fidelity cDNA Synthesis kit*⁴ (kit A) and Random hexamers. Differences when using *Oligo(dT)n* or other common kits such as *Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase*⁵ (kit B) are indicated in each step.

1. Transfer 37.6 µL from the aqueous phase obtained in step 1.3.6 to a fresh 0.2-mL PCR tube.
2. Add 8 µL of Random hexamers and denature the mixture by heating the tube for 10 min at 65°C in a thermocycler. Also, set a program in the thermocycler that immediately cools the tubes to 4°C.
 - Random hexamers primed RT showed a smaller yield than other options in controlled experiments. However, for silenced gene expression analysis, oligo(dT)n should only be used with intact RNA or experiments that require examination of splice variants. In that case, use 4–8 µL of oligo(dT)n (complete with water until 8 µL).

⁴Roche cat. Numbers: 05081955001/05091284001/05081963001. http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_6_8_39_1_3.html.

⁵Invitrogen cat. Numbers: 18080-093/18080-044/18080-085. http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Amplification-and-Expression-Profilng/Reverse-Transcription-and-cDNA-Synthesis/RT___cDNA_Synthesis-Misc/SuperScript.html.

Table 22.1 Quantities per tube for preparing a master mix for cDNA synthesis. Kit A: Roche Transcription High Fidelity cDNA Synthesis kit. Kit B: Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase

	Kit A	Kit B
Buffer	16	16
DTT	4	4
dNTP mix	8	Previously added
Reverse transcriptase	4.4	4
Inhibitor	2 (Protector RNase Inhibitor)	4 (RNaseOUT)
	34.4	28

Table 22.2 Conditions for cDNA synthesis. Kit A: Roche Transcription High Fidelity cDNA Synthesis kit. Kit B: Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase

	Random hexamers		Oligo(dT)	
	Kit A	Kit B	Kit A	Kit B
Preincubation	29°C for 10 min	25°C for 5 min	-	-
Elongation	48°C for 60 min	50–55°C for 60 min	45–55°C for 30 min	50–55°C for 60 min
Inactivation	85°C for 5 min	70°C for 15 min	85°C for 5 min	70°C for 15 min
Cooling	4°C less than 2 h. Store it at –20°C until 6 months			

- For kit B use the same quantities of primers and also add 4 μL from the dNTP mix and 6.4 μL of water.
3. Prepare a master mix with the quantities per tube that are shown in Table 22.1. Add 34.4 μL (or 28 μmL) to each tube for a final volume of 50 μL .
 4. Set up the conditions shown in Table 22.2 in your thermocycler of choice according to the kit used.
 5. PCR amplification of synthesized cDNA and quantification of the amplification products in real time.

Quantitative Polymerase Chain Reaction

In this example, we expect the simultaneous silencing of two highly similar transcription factors [26–28]. The wild-type strain and five transformed strains will be analyzed by using three sets of primers for the 5', central and 3' regions of each of the target genes, and 4 endogenous genes. Also, controls for primer contamination and RNA contamination will be included. Our qPCR equipment accepts 96rx plates, so three plates will be needed. Also, a calibrator (a common sample) for each gene must be included in all the plates to allow later normalizing for interplate variation.

Place the tubes on ice during the whole process. Keep SYBR Green that contains reagents in darkness.

1. Mix 1,344 μL of 2X SYBR Green Buffer with 591.36 μL of water in a 2-mL tube and vortex. Mix 5 μL of 2 \times Buffer with 3.2 μL of water for each reaction and add a 5% more to the final volume to prevent high volumes pipetting deviation.
2. Place six 1.5 mL tubes on ice. Mark them 1 to 6. Transfer 648 μL (90rx) to the first tube (1) and 216 μL (30rx) to the other (2 to 6). Set two tubes for the negative controls and mark them. Transfer 72 μL (10rx) and 43.2 μL (6rx) to each of them.
3. Add 180 μL of wild-type cDNA (RT product) to the first tube (1) and 60 μL of each of the five transformants to the other tubes (2 to 6). Add 20 μL and 4.8 μL of water to the respective negative controls. Always add cDNA before primers even if the number of samples is higher than the number of primers. Use 2 μL of RT product per reaction.
4. Place 30 tubes (3 columns and 10 rows) in a rack on ice and mark them 1 to 30. Add 27.6 μL from tubes 1, 2 and 3 to each tube of the first, second and third rack columns, respectively.
5. In ten new tubes mix 12 μL of forward and reverse 10 μM primers of each set. Add 2.4 μL of the primers mix to the three tubes of each row. Three tubes in the first row from the first primer tube, second row from the second primer, etc.

6. Centrifuge the tubes for 1 min at 12,000×g. Place all the tubes on ice in darkness.
 7. Mix by pipetting. Pipette 9 μL in three contiguous wells and discard the rest. If you followed the numerical order, the first 3 wells will contain the tube 1 mix which corresponds with the first sample and first primer, the next 3 wells will contain the tube 2 which corresponds with the second sample and the second primer, and so on, as indicated in the previous schema. Pipetting 9 μL instead of 10 μL will prevent a smaller volume in the last well by previous-steps pipetting errors.
 8. In the last plate, pipette 9.2 μL from the first negative control tube (10rx) in 10 contiguous wells. Add 0.8 μL from the first primer mixture in the first well and so on. Pipette 8 μL from the second negative control tube (6rx) in 6 contiguous wells. Add 2 μL of RNA extraction of the first sample (wild-type) in the first well and so on.
 9. Briefly centrifuge the qPCR plate and load it in the thermocycler. Set up the appropriate program.
- (1–40/45) and the first two columns for the gene and sample information.
 2. With the Excel program running, start the LinRegPCR (<http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=0>) program [17]. Select the Excel workbook with the fluorescence raw data and appropriate range of rows and columns.
 3. Determine the baselines. Select *Amplicon group* for group-based window-of-linearity and open the *Amplicon Groups* tab. Make a group for each amplicon according to the information in the first two columns. If you place the gene information in the first column, select “base groups on 1st part of the sample name from the front” and press *Group Samples* and *Set W-o-L* (Window of linearity) *per group*.
 4. Save the results in the Excel workbook. You should have an average PCR efficiency value (column N) for each gene (group).

Data Analysis

Determine PCR Efficiency from RAW Data

1. Export the fluorescence raw data (not the C_t values) without baseline correction. Import the data in an Excel workbook. In most cases⁶ raw data can be exported as a text or cvs file that can be imported in Excel using the import wizard. Set a sample per row and the fluorescence values for each cycle in columns. Keep the first row for the cycle numeration
1. Prepare a new Excel workbook with the average C_t and standard deviation for each combination of sample and gene. Values for each three replicas should be homogeneous, otherwise discard the value that clearly deviates from the other two. Place genes in the columns and strains (samples) in the rows. In our example that would make for 6 rows and 10 columns (plus headers). Also, insert the previous efficiency value of each gene into the new Excel workbook.
 2. Calculate the ratio (R) between two plates of the average C_t s for each gene in the calibrator (wild-type sample). You can accept variations lower than 3% ($1.03 > R_n > 0.97$).
3. Calculate the ratio (R) between two plates of the average C_t s for each gene in the calibrator (wild-type sample). You can accept variations lower than 3% ($1.03 > R_n > 0.97$).
 4. Calculate for each gene the difference (ΔC_t) between the average C_t of a transformant and the wild-type strain, repeat it with the other transformants. Calculate also the ΔC_t of the wild-type strain, which must be 1. For each ΔC_t also calculate the error (E) of the two respective deviations.

$$R = (\text{average } C_{t_{\text{wild-type, gene n}}})^{\text{Reference plate}} \div (\text{average } C_{t_{\text{wild-type, gene n}}})^{\text{Other plate}}$$

⁶For *Roche Lightcycler 480* there is an import tool available in <http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=0>

$$\Delta C_{t_{\text{sample } n, \text{ gene } m}} = \text{average } C_{t_{\text{sample } n, \text{ gene } m}} - \text{average } C_{t_{\text{wild-type, gene } m}}$$

$$E_{\text{sample } n, \text{ gene } m} = \left((SD_{\text{sample } n, \text{ gene } m})^2 + (SD_{\text{wild-type, gene } m})^2 \right)^{0.5}$$

Validate Reference Genes

1. Prepare a new Excel workbook with the ΔC_t for each combination of sample and (only) endogenous gene. Place genes in the columns and strains in the rows.
2. Open geNorm plugin (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) in a new Excel. Load the previous table with ΔC_t values. Press *Calculate*. Check the result matrix and discard

any endogenous gene with a stability value (M) higher than 1.5.

Quantify Relative Expression Values

1. Check that your Excel workbook includes the efficiency values of all the genes, the ΔC_t and prolonged error of all the gene and sample combinations, and that unstable endogenous genes have been discarded.
2. Calculate the relative expression of a target gene with respect to the calculated mean of the endogenous genes for each of the samples. For each relative expression value, calculate the expanded error (EE) of the ΔC_t (target gene and n endogenous genes).

$$RQ_{\text{sample } n, \text{ target gene } i} = \text{Efficiency}_{\text{target gene } i} (\Delta C_{t_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}}) \div \prod_j (\text{Efficiency}_{\text{endogenous gene } j} (\Delta C_{t_{\text{sample, endogenous gene } j}}))$$

$$EE_{\text{sample } n, \text{ target gene } i} = \left((E_{\text{sample } n, \text{ target gene } i})^2 + (E_{\text{sample } n, \text{ endogenous gene } 1})^2 + \dots + (E_{\text{sample } n, \text{ endogenous gene } j})^2 \right)^{0.5}$$

3. Calculate the minimum and maximum relative expression considering the relative expression error (EE).

$$RQ_{\text{max}_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}} = \text{Efficiency}_{\text{target gene } i} (\Delta C_{t_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}} + EE_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}) \div \prod_j (\text{Efficiency}_{\text{endogenous gene } j} (\Delta C_{t_{\text{sample, endogenous gene } j}}))$$

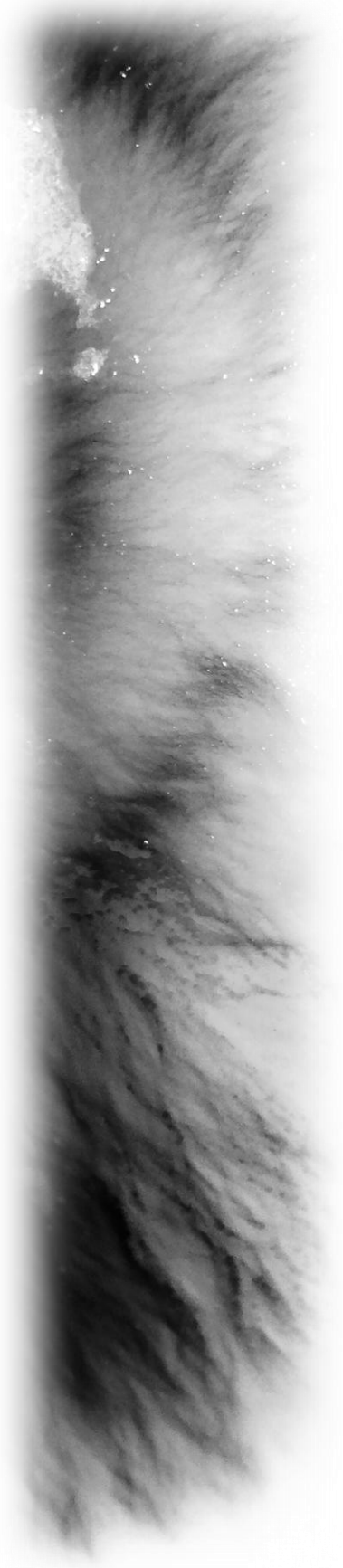
$$RQ_{\text{min}_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}} = \text{Efficiency}_{\text{target gene } i} (\Delta C_{t_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}} - EE_{\text{sample } n, \text{ target gene } i}) \div \prod_j (\text{Efficiency}_{\text{endogenous gene } j} (\Delta C_{t_{\text{sample, endogenous gene } j}}))$$

4. Express the result as a value and a range in the form $RQ_{\text{sample, target gene}} (RQ_{\text{min}_{\text{sample, target gene}}} RQ_{\text{max}_{\text{sample, target gene}}})$. Notice that though wild-type relative expression is 1, its EE is not 0, so its expression can also show a range of values.
5. dsRNA-mediated silenced transformants should show a clear reduction of the relative expression of the analyzed gene with respect to the wild-type strain. Analyze the results obtained for each gene expression separately, as it is likely that results vary depending on the primer binding place in the target mRNA. If the results obtained when using a certain set of primers show a higher expression in the putative silenced strains than in the wild-type strain discard them, as it can be the result of incomplete degradation of the flanking mRNA regions.

References

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806–811
2. Salame TM, Ziv C, Hadar Y, Yarden O (2011) RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. Appl Microbiol Biotechnol 89:501–512
3. Liu H, Cottrell T, Pierini L, Goldman W, Doering T (2002) RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genetics 160:463–470
4. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A 95:14687–14692
5. Janus D, Hoff B, Hofmann E, Kück U (2007) An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. Appl Environ Microbiol 73:962–970

6. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559–1582
7. Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39
8. Thellin O, ElMoualij B, Heinen E, Zorzi W (2009) A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. *Biotechnol Adv* 27:323–333
9. Vandesompele J, Kubista M, Pfaffl M (2009) Reference gene validation software for improved normalization. In: Logan J, Edwards K, Saunders N (eds) *Real-time PCR: current technology and applications*. Caister Academic, Norwich, pp 47–64
10. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):research0034.1–research0034.11
11. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498
12. Van Maerken T, Mestdagh P, De Clercq S, Pattyn F, Yigit N, De Paepe A et al (2009) Using real-time qPCR to evaluate RNAi-mediated gene silencing. In: *BioTechniques protocol guide 2009*. p. 47. Biotechniques, NY, USA. DOI: 10.2144/000113006
13. Schmittgen T, Livak K (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
14. Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408
15. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
16. Ramakers C, Ruijter J, Deprez R, Moorman A (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62–66
17. Ruijter J, Ramakers C, Hoogaars W, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff M et al (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37(6):e45
18. Nordgård O, Kvaløy JT, Farmen RK, Heikkilä R (2006) Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: the balance between accuracy and precision. *Anal Biochem* 356:182–193
19. Huggett J, Dheda K, Bustin S, ZumLa A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284
20. Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27:126–139
21. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirota M, Fleischmann AR et al (2005) Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 85:1040–1050
22. Nolan T, Bustin SA (2004) Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech* 15:155
23. Stahlberg A (2004) Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem* 50:509–515
24. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellems J, Huggett J, Kubista M et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611
25. Bustin S, Beaulieu J, Huggett J, Jaggi R, Kibenge F, Olsvik P et al (2010) MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 11:74
26. Ramos B, Alves-Santos FM, García-Sánchez MA, Martín-Rodríguez N, Eslava AP, Díaz-Mínguez JM (2007) The gene coding for a new transcription factor (*ffl1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet Biol* 44:864–876
27. de Vega-Bartol JJ, Martín-Domínguez R, Ramos B, García-Sánchez MA, Díaz-Mínguez JM (2011) New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ffl1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101:470–479
28. Alves-Santos F, Ramos B, García-Sánchez MA, Eslava AP, Díaz-Mínguez JMA (2002) DNA-based procedure for in-planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92(3):237–244



-Resumen-

El objetivo del presente capítulo es exponer un protocolo útil para calcular de una manera precisa la cantidad de ARNm que es degradado debido al silenciamiento por medio de ARNi en hongos filamentosos.

La principal característica de los transformantes silenciados en hongos es el amplio rango de fenotipos que pueden ser observados debido a una reducción variable de la cantidad de ARNm diana. La detección del rango de variación del transcrito reverso de la molécula de ARNm requiere un método muy sensible como lo es el método de PCR a tiempo real, también llamado PCR cuantitativa (qPCR).

Este método es preferible al análisis *Northern Blot* y a la tecnología de *microarrays* cuando se quiere analizar la expresión de un número limitado de muestras en las que las diferencias de expresión son pequeñas, como es el caso que nos ocupa, debido a la eficiencia, sensibilidad, rapidez y a un relativo bajo coste.

El método de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) incluye dos etapas principales. La primera, la obtención de ADNc a partir de una extracción de ARN total. La segunda, la técnica de qPCR propiamente dicha: la amplificación de ADNc y la correspondiente cuantificación del amplicón obtenido en cada ciclo, interpretando los datos de medida que ofrece el programa utilizado.

Transcripción reversa desde ARN para la obtención de ADNc

Hasta la fecha de publicación del presente capítulo el procedimiento más utilizado para el aislamiento de ARN total en hongos es el protocolo basado en el método Tri Reagent®, en contraposición a los métodos basados en mini-columnas de purificación. El protocolo incluye los pasos de homogeneización del tejido, adición del reactivo Tri-Reagent y obtención de una mezcla uniforme, que tras la adición de cloroformo y centrifugado puede separarse en tres fases: una orgánica de color rojo que contiene proteínas, una interfase que contiene ADN y una fase acuosa superior incolora que contiene ARN. Los siguientes pasos del protocolo corresponden a lavados y precipitación de ácidos nucleicos con el fin de obtener una solución de ARN en agua Milli-Q tratada con DEPC 1% (V/V) lo más pura posible.

Para la completa resuspensión del ácido nucleico es necesario calentarlo entre 5 y 10 minutos a 55°C. Tras ello, es imprescindible cuantificar la concentración, pureza y calidad del ARN. Utilizando un espectrofotómetro Nanodrop™ podemos conocer la concentración y pureza utilizando pequeños volúmenes (1 µL) de muestra, mientras que realizando una electroforesis en geles de agarosa (1% m/V) podemos comprobar su calidad al observar dos bandas de un peso alrededor de 2 y 4 Kb que corresponden a ARN ribosomal 18S y 28S respectivamente.

En la extracción es necesario realizar un tratamiento con ADNasa para eliminar cualquier traza de ADN que pudiera interferir en la PCR a tiempo real. El tratamiento consta de una incubación de la muestra junto con la enzima ADNasa durante 30 minutos a 37°C y su posterior inactivación mediante un inhibidor de ADNasa. Por último, para comprobar que no existe contaminación por ADN se recomienda amplificar un gen control mediante PCR convencional y comprobar que tal amplificación no ha ocurrido.

La síntesis de ADNc propiamente dicha puede realizarse mediante una gran variedad de kits comerciales, entre los que destacamos el kit de Roche *Transcription High Fidelity cDNA Synthesis kit* e *Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase*. Ambos kits funcionan bien con muestras de ARN total de hongos filamentosos. Comparten un protocolo similar: fase de preincubación, en el caso que se usaran hexámeros aleatorios como cebadores en lugar de oligonucleótidos poli-dT; fase de elongación, con una duración de 60 minutos y temperatura de 48-55°C; fase de inactivación de enzima transcriptasa mediante calor y, por último, una fase de enfriamiento a 4°C y posterior conservación a -20°C.

PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa (qPCR) se basa en la detección a tiempo real de un amplicón generado por PCR, utilizando un marcador fluorescente de ácidos nucleicos, como es

por ejemplo el marcador SYBR Green, cuya conformación molecular cambia al unirse a la doble cadena de ADN resultando en un incremento de fluorescencia.

Cada reacción de qPCR se caracteriza por el ciclo en que la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN producido en cada ciclo de PCR, se eleva por encima de un umbral definido, parámetro denominado ciclo umbral (Ct). Por tanto, cuanto mayor sea la cantidad de ADN de partida menor será el ciclo umbral, y viceversa. Para una correcta medición de los valores de Ct que reflejen solamente una variación biológica es necesario normalizarlos frente a la concentración de ADNc inicial en cada muestra, con el fin de corregir la variabilidad asociada con diferentes pasos del procedimiento experimental, como pueden ser el rendimiento de extracción de ARN y las diferencias en la actividad transcripcional de las células analizadas.

Existen dos métodos para cuantificar la cantidad de ADN molde: cuantificación absoluta, interpola el Ct calculado de la muestra en una curva de calibración que relaciona ciclos umbrales con concentraciones fijas de ADN; y cuantificación relativa, la que nos ocupa y que relaciona el Ct del ADNc del gen en estudio con el de un gen endógeno (transcrito de manera constante).

Un aspecto importante a tener en cuenta es el diseño de cebadores que se van a utilizar para la amplificación en una PCR cuantitativa. Estos cebadores deben de amplificar un fragmento aproximadamente de entre 100 y 150 pb, sin exceder de 250 pb. Es importante conocer los rangos de eficiencia de cada pareja de cebadores para asegurar una correcta cuantificación de la expresión génica.

La reacción de PCR cuantitativa incorpora los mismos reactivos que una PCR convencional (Buffer, dNTPs, cebadores, ADN molde, enzima polimerasa) además de un marcador de ácidos nucleicos, como puede ser el SYBR Green. Estos marcadores son fotosensibles, por lo que se recomienda el manejo en condiciones de oscuridad y frío. Por lo general los equipos para desarrollar esta técnica cuentan con una base metálica para llevar a cabo las reacciones en una placa 96 pocillos (9 filas x 12 columnas). Recomendamos realizar cada reacción por triplicado y, si es necesario, utilizar más de una placa multipocillo y la inclusión de un calibrador (una muestra común) por cada gen en cada placa multipocillo, con el fin de poder normalizar la variación entre las distintas placas de reacción.

La variación de los datos del ciclo umbral medio entre dos placas (R) no ha de ser mayor al 3% para cada gen analizado.

Para conocer la expresión relativa de un gen en una determinada muestra lo primero es conocer su ΔCt , que es la diferencia en el Ct medio obtenido para un gen en una determinada muestra (en este caso un transformante silenciado en el gen) y el Ct medio obtenido para el mismo gen en una muestra de referencia (en este caso la estirpe silvestre). El ΔCt en la muestra silvestre o en la utilizada como referencia ha de ser 1. Además se ha de calcular el error (E) de ambas desviaciones:

$$\Delta Ct_{\text{muestra n, gen m}} = \text{media } Ct_{\text{muestra n, gen m}} - \text{media } Ct_{\text{silvestre, gen m}}$$

$$E_{\text{muestra n, gen m}} = ((\text{Std dev}_{\text{muestra n, gen m}})^2 + (\text{Std dev}_{\text{silvestre, gen m}})^2)^{0.5}$$

Una vez conocidos estos valores es imprescindible comprobar los datos obtenidos en diferentes muestras para el gen utilizado como endógeno. Si presenta un valor de estabilidad menor de 1,5 podrá considerarse un buen gen endógeno; de lo contrario ha de ser descartado.

Por último se calcula la expresión relativa (RQ) de un gen diana respecto al cálculo de la media de los genes endógenos para cada una de las muestras. Para cada valor es necesario calcular el mínimo y el máximo valor de expresión relativa (RQ_{\min} , RQ_{\max}) teniendo en cuenta el error de expresión relativa (EE).

$$RQ_{\text{muestra n, gen diana i}} = \text{Efic}_{\text{gen diana i}} (\Delta Ct_{\text{muestra n, gen diana i}}) / \prod^j (\text{Efic}_{\text{gen endógeno j}} (\Delta Ct_{\text{muestra, gen endógeno j}}))$$

$$EE_{\text{muestra n, gen diana i}} = ((E_{\text{muestra n, gen diana i}})^2 + (E_{\text{muestra n, gen endógeno 1}})^2 + \dots + (E_{\text{muestra n, gen endógeno j}})^2)^{0.5}$$

$$RQ_{\max_{\text{muestra n, gen diana i}}} = \text{Efic}_{\text{gen diana i}} (\Delta Ct_{\text{muestra n, gen diana i}} + EE_{\text{muestra n, gen diana i}}) / \prod^j (\text{Efic}_{\text{gen endógeno j}} (\Delta Ct_{\text{muestra, gen endógeno j}}))$$

$$RQ_{\min_{\text{muestra n, gen diana i}}} = \text{Efic}_{\text{gen diana i}} (\Delta Ct_{\text{muestra n, gen diana i}} - EE_{\text{muestra n, gen diana i}}) / \prod^j (\text{Efic}_{\text{gen endógeno j}} (\Delta Ct_{\text{muestra, gen endógeno j}}))$$

Conclusión final

El silenciamiento génico en los hongos produce una gama de fenotipos correlacionados con las diferentes cantidades de ARNm diana que se degradan por la maquinaria de ARNi en cada estirpe transformada. La detección de este rango de variación requiere un método rápido y sensible, siendo el método de PCR a tiempo real muy adecuado para este análisis.



*-Discusión
general-*

Nuestras hipótesis y planteamientos iniciales describen en el genoma de *F. oxysporum* dos genes codificantes de factores de transcripción diferenciados: *FTF2* (*Fusarium Transcription Factor 2*), gen bien conservado en el genoma de hongos filamentosos, presente en forma de copia única; y *FTF1* (*Fusarium Transcription Factor 1*), gen exclusivo de estipes muy virulentas de *F. oxysporum* con un número de copias variable en el genoma.

El presente trabajo muestra evidencias que ratifican la diferenciación de ambos genes desde un punto de vista funcional. El más significativo es la diferencia en cuanto al patrón de expresión: *FTF1* únicamente se expresa durante la colonización de la planta, mientras que la expresión de *FTF2* permanece relativamente constante durante el crecimiento *in vitro*, y no se induce de forma significativa durante la colonización del hospedador. Esta diferencia en el patrón de expresión debe de correlacionarse con diferencias en la secuencias nucleotídicas de los promotores de ambos genes. Los análisis *in silico* muestran que la semejanza en la regiones promotoras es tan sólo del 55-65%, frente a un 80-85% de semejanza en las regiones codificantes. Las probables diferencias en la regulación explicarían que *FTF1* pueda estar involucrado en la virulencia de *F. oxysporum*, regulando, entre otros, efectores como *SIX1* y *SIX6*, mientras que el aporte de *FTF2* a la virulencia es menor.

Si bien la diferencia funcional entre *FTF1* y *FTF2* está clara, las regiones codificantes comparten una homología del 80-85% en secuencia nucleotídica y 83-89% en secuencia aminoacídica, lo que plantea ciertas reservas sobre la consideración de estos genes como diferentes entre sí. En este contexto adquiere relevancia el apelativo de “Familia génica *FTF*”.

En este trabajo se ha pretendido esclarecer la aportación colectiva de esta familia génica y, en particular, de las copias del gen *FTF1* en la colonización del hospedador vegetal y en la regulación de efectores producidos por *F. oxysporum*.

Papel de *FTF1* en la colonización del huésped

Las diferencias en la colonización del hospedador vegetal por estirpes poco y muy virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se evidencian en dos aspectos: el primero de tipo cuantitativo, la estirpe muy virulenta prolifera de manera masiva respecto a la estirpe poco virulenta; y un segundo aspecto de tipo cualitativo, la rapidez en alcanzar el sistema vascular y la proporción de haces xilemáticos colonizados es muy superior en la estirpe virulenta. Estas diferencias en el patrón de colonización resultan evidentes desde el inicio de la infección, pero son especialmente significativas a partir de la primera semana, cuando se produce la colonización del hipocotilo de la planta. En este periodo de tiempo, *FTF1*, gen exclusivo de estirpes muy virulentas y súper virulentas (de Vega-Bartol *et al.*, 2011), comienza a expresarse, al menos la copia *phas14257*, como indica el estudio microscópico de colonización del transformante *SP1PFTF1::GFP*. Además los mutantes silenciados en la familia génica *FTF* presentan un patrón de colonización diferente a una estirpe muy virulenta: tanto la masa miceliar como la proporción de haces vasculares colonizados se redujeron, acercándose a los parámetros de una infección característica de una estirpe poco virulenta.

Entre las hipótesis que barajamos sobre la función que desempeña *FTF1* en el patrón de colonización destacan dos: facilitar el acceso de *F. oxysporum* a zonas vasculares de la planta, o bien fomentar el crecimiento miceliar en la zona vascular. Este segundo supuesto se considera más plausible, ya que la copia *phase14257* sólo es expresada durante la colonización del tejido xilemático, aunque no se puede descartar que otras copias parálogas de *FTF1* tengan un patrón de expresión diferente según la localización del micelio. Al tratarse de un gen codificador de un factor de transcripción, la manera de fomentar el crecimiento en la zona vascular puede ser debido a múltiples opciones que están por dilucidar: entre ellas, una regulación del metabolismo propio del crecimiento en haces xilemáticos (regulación de factores de transcripción como *FNR1* y *RHAR1* inducidos en condiciones pobres de nitrógeno (Divon *et al.*, 2006) y en la necesidad de metabolizar L-ramnosa como fuente de carbono procedente de la pared celular de las células vegetales (Pardo y Orejas, 2014; Tamayo-Ramos *et al.*, 2012), respectivamente); y una regulación de factores implicados en virulencia, como

por ejemplo la regulación positiva de efectores o incluso la regulación negativa de genes de avirulencia.

Al igual que otros trabajos sobre el complejo de especies de *F. oxysporum* (Czymmek *et al.*, 2007; van der Does *et al.*, 2008b), nuestros ensayos microscópicos no muestran esporulación dentro de los haces vasculares en las plantas colonizadas por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, así que parece descartable la posibilidad de que FTF1 esté relacionado con la esporulación, mientras que se ha descrito que FTF2 participa en la producción de ascosporas en *Fusarium graminearum* (Son *et al.*, 2011).

Papel de *FTF1* en la regulación de genes efectores

Muchas proteínas secretadas durante la colonización en el hospedador han sido identificadas mediante secuenciaciones completas de genomas y ensayos proteómicos, incluyendo proteínas pequeñas generalmente ricas en residuos de cisteína, proteínas de inducción de muerte celular y enzimas (de Sain y Rep, 2015). Experimentos de delección génica han proporcionado evidencias de que algunas de estas proteínas son necesarias para la patogenicidad, mientras que el papel de otras aún sigue siendo enigmático. Por otra parte, el sistema inmune de la planta puede reconocer algunas de estas proteínas secretadas, lo cual destacaría su papel en la inducción de resistencia a la enfermedad. Las proteínas pequeñas ricas en cisteínas, codificadas por los genes *SIX*, constituyen el grupo mejor conocido de proteínas secretadas por *F. oxysporum* implicadas en una colonización eficiente del hospedador vegetal (Michielse *et al.*, 2009a). Hasta la fecha lo componen 14 genes (Houterman *et al.*, 2007) que representan una huella genómica que permite distinguir unas formas especiales de otras, incluso diferentes razas y estirpes (van der Does *et al.*, 2008a). Así por ejemplo, *SIX2*, *SIX3* y *SIX5* son exclusivos de *Fol*, permitiendo los diferentes polimorfismos de *SIX3* distinguir la raza 2 de la raza 3 (Lievens *et al.*, 2009). La clasificación de los genes *SIX* no obedece a una cuestión filogenética, sino a la implicación de éstos en un proceso de señalización favorable para la colonización del xilema.

En este trabajo se muestran varias evidencias de que el factor de transcripción FTF1 regula positivamente los genes *SIX1* y *SIX6*: (1), durante la colonización de *Phaseolus vulgaris* por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* el patrón de expresión de *FTF1* coincide con el de ambos genes efectores; (2), la expresión constitutiva de *FTF1*, obtenida por la fusión de la región codificante con el promotor constitutivo *PgpdA* en los transformantes *SP1PgpdA::FTF1*, incrementa la expresión de ambos genes efectores así como la expresión del gen *SGE1*, que codifica un regulador de la expresión de algunos genes *SIX* (*SIX1*, *SIX2*, *SIX3* y *SIX5*) en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Michielse *et al.*, 2009b); (3), el silenciamiento específico de los genes *FTF* inducido en los mutantes *SP1FTFRNAi* ocasiona un descenso en la expresión de ambos genes efectores durante la colonización de los hospedadores vegetales por *F. oxysporum* ff. spp. *phaseoli* y *lycopersici*, incluso la reducción de la expresión de *SGE1* en la forma especial *phaseoli*.

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, postulamos para las copias parálogas de *FTF1* un papel regulador maestro de la expresión de los genes *SIX1* y *SIX6*; quizá no de forma directa, sino a través de una cascada de señalización tal, que la expresión de *SIX1* dependa de la expresión de *SGE1*, que a su vez dependa del factor de transcripción *FTF1*. Por otra parte, *SIX6* también está regulado positivamente por *FTF1*; aún se desconoce si de manera directa, pero resulta

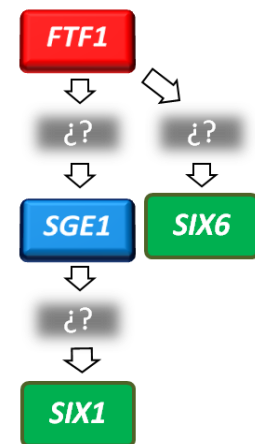


Figura 7. Hipotética cascada de señalización reguladora de los genes efectores *SIX1* y *SIX6* en *F. oxysporum*.

dudoso puesto que *SIX6* es el único gen perteneciente a los *SIX* que no es exclusivo de *F. oxysporum*: además de encontrarse en las formas especiales *melonis*, *niveum*, *radicis-cucumerinum*, *passiflorae*, *vasinfectum*, *cubense*, *lycopersici* y *phaseoli* se encuentra presente en dos especies del género *Colletotrichum*: *C. orbiculare* y *C. higginsianum* (Gawehns *et al.*, 2014). El género *Colletotrichum* dispone de una copia del gen *FTF2* pero no de *FTF1*, que es exclusivo de *F. oxysporum*, lo que hace pensar que *SIX6* esté regulado indirectamente por *FTF1* en *F. oxysporum*.

La presencia de otros genes *SIX* (*SIX8* y *SIX11*) (Houterman *et al.*, 2007) fue revelada en la forma especial *phaseoli* mediante PCR. Debido a la gran cantidad de

intrones y largas secuencias no codificantes que interrumpen la secuencia codificante de *SIX8*, no pudimos garantizar la integridad completa del gen. Por el contrario, *SIX11*, gen bien conservado en todas las formas especiales de genomas accesibles, pudo ser analizado, no mostrando alteración de su expresión en los ensayos *in vitro* realizados con los transformantes que expresaban constitutivamente *FTF1*.

Origen de *FTF1*

Al igual que todos los genes efectores *SIX* descritos, los genes parálogos de *FTF1* se encuentran en regiones accesorias o *LS*, las cuales muestran características diferentes en comparación con el núcleo del genoma o *core genome*. Las regiones *LS* disponen de una altísima densidad de elementos transponibles (Ramos *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2013), y son mucho más divergentes entre las diferentes formas especiales, lo que sugiere un papel en la adaptación a la interacción con el hospedador (Ma *et al.*, 2010). De hecho, la transferencia del cromosoma accesorio 14 de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) a la estirpe Fo-47 no patógena convirtió a ésta en patógena del tomate (Ma *et al.*, 2010).

Existen varias hipótesis que pueden explicar el origen de las regiones *LS* que albergan genes cruciales para la patogenicidad de *F. oxysporum*. Entre ellas, se encuentra que estas regiones estuvieran presentes en un antecesor común del género *Fusarium*, y que especies como *F. graminearum* y *F. verticillioides* hubieran perdido esta información durante la transferencia vertical.

Entre las más plausibles se encuentra la adquisición de estas regiones mediante transferencia horizontal (Ma *et al.*, 2010). En apoyo a esta hipótesis hay que destacar que el 90% de los genes presentes en el *core genome* de *Fol* se encuentran también en *F. graminearum* y *F. verticillioides*, mientras que solamente la mitad de genes de las regiones *LS* de *Fol* presentan homología con genes de los genomas de *F. graminearum* y *F. verticillioides* (Ma *et al.*, 2010). Además los genes ortólogos del *core genome* muestran una menor divergencia entre *Fol* y *F. verticillioides* que entre *Fol* y *F. graminearum*, lo que no sucede con los genes ortólogos de la región *LS*, cuya divergencia es aproximadamente la misma para ambas especies, indicando que la

filogenia de los genes en regiones accesorias difiere de los genes en el núcleo del genoma. En la Fig. 8, A (Ma *et al.*, 2010) se muestra la relación filogenética discordante que sustenta esta conclusión. El 93% de las proteínas codificadas por los genes presentes en las regiones *LS*, aún difiriendo en el uso de codones, son de origen fúngico; en concreto de hongos ascomicetes, estando más relacionadas filogenéticamente con el género *Fusarium*, por lo que la mejor explicación proporcionada hasta la fecha sobre el origen de las regiones *LS* es que las mismas se han adquirido mediante transferencia horizontal a partir de otras especies del género *Fusarium* (Ma *et al.*, 2010).

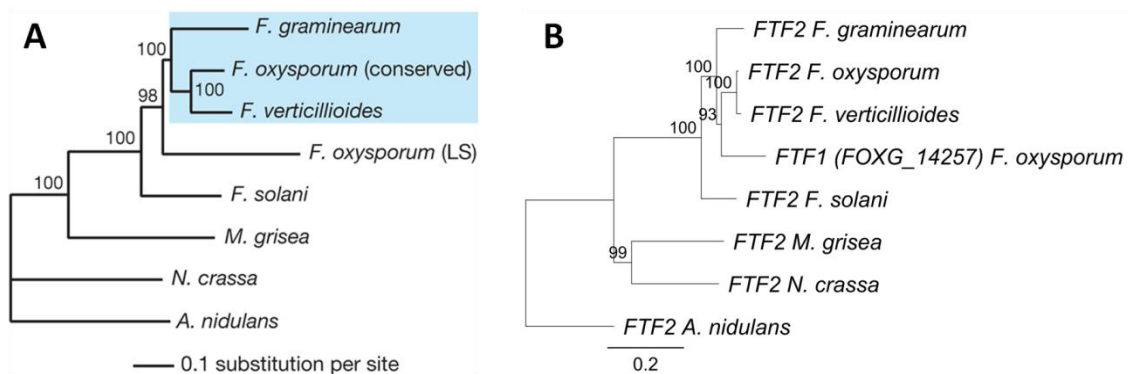


Figura 8. Relación filogenética discordante de proteínas codificadas en las regiones LS. A. Árbol de máxima verosimilitud de proteínas concatenadas de 100 genes seleccionados al azar de 362 genes que comparten homólogos en hongos ascomicetos (Ma *et al.*, 2010). B. Árbol de máxima verosimilitud de las proteínas FTF. Los árboles incluyen los genomas anotados del género *Fusarium* *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*, *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*. Las construcciones filogenéticas fueron llevadas a cabo mediante *PhyML* usando un test *bootstrap* de 10.000 réplicas. La escala indica la longitud de las ramas que representan una sustitución por sitio.

La familia génica *FTF* constituiría, a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, un excelente ejemplo al respecto. El gen *FTF2*, ampliamente distribuido y bien conservado en hongos ascomicetos, representaría el gen ortólogo presente en el *core genome*, mientras que *FTF1* representaría el gen parálogo presente en la región *LS*. Las hipótesis sobre el origen de *FTF1* que barajamos son básicamente dos:

a) El gen *FTF1* se generaría en las regiones *LS* de *F. oxysporum* gracias a una transferencia horizontal, probablemente de *FTF2*, por algún miembro del género *Fusarium*. El gen se diversificó en las regiones *LS* mediante duplicaciones y mutaciones gracias a la cantidad extremadamente numerosa de transposones en estas regiones

(Schmidt *et al.*, 2013). Un hecho que apoya esta hipótesis es que el factor de transcripción *FTF1* no esté estrechamente relacionado a la proteína paróloga *FTF2* de *F. oxysporum* (Fig. 8, B).

b) Las copias parálogas de *FTF1* provendrían de *FTF2* por una duplicación ancestral de este gen ocurrida únicamente en el linaje de *F. oxysporum*, duplicación que se habría amplificado en las regiones *LS* como consecuencia de la actividad de elementos transponibles, especialmente abundantes en las regiones *LS* (Schmidt *et al.*, 2013). La acumulación de mutaciones en las regiones promotoras, algunas de ellas provocadas por la propia inserción de transposones, habrían producido la inactivación de algunas de las copias parálogas, en tanto que otras mutaciones podrían haber cambiado la especificidad de inducción de *FTF1* respecto de *FTF2*.

Los transposones desempeñan un papel en la diversificación genética (Ramos *et al.*, 2007; Rep y Kistler, 2010) debido a la generación de segmentos de ADN repetidos, que a su vez pueden acelerar la evolución de estos segmentos, pudiendo ser la clave de adaptación a nuevos hospedadores (Ma *et al.*, 2010).

El potencial de los elementos transponibles para afectar a la estructura del genoma es una consecuencia de su movilidad. Existen dos clases de elementos transponibles según la estrategia de transposición. La clase I o retrotransposones, actúan mediante un mecanismo de “copiar y pegar”, se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después a ADN mediante una retrotranscriptasa. La clase II o ADN transposones actúan mediante un mecanismo de “cortar y pegar” en el que interviene una enzima transposasa, moviéndose directamente de una posición a otra en el genoma, aunque en algunas ocasiones la copia puede ser conservada también en el locus donador (Finnegan, 1989). Entre los elementos transponibles de la clase II se encuentra la familia MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements), o elementos transponibles de corta longitud no autónomos debido a la delección de su transposasa (Feschotte y Pritham, 2007). Las regiones *LS* de *F. oxysporum* están enriquecidas en ambas clases de elementos transponibles: los retrotransposones aparecen distribuidos homogéneamente a lo largo de estas regiones mientras que los ADN transposones se concentran en regiones enriquecidas en genes efectores, cuyos promotores tienen la singularidad de albergar un elemento transponible tipo *mimp* de

la familia MITE, que permite la identificación de candidatos de genes efectores en otras formas especiales. Es posible que la propia secuencia *mimp* actúe como sitio de unión de factores de transcripción que regulen la expresión de estos genes efectores (Schmidt *et al.*, 2013).

Las dos copias perfectamente anotadas del gen *FTF1* en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* se encuentran en un cromosoma accesorio de 1,8 Mb. Aproximadamente a 1,3 Kb desde el codón de parada se encuentra un elemento transponible de clase I llamado *Marsu* (Ramos *et al.*, 2007) que había sido previamente descrito en *F. oxysporum* (Daboussi y Langin, 1994). El estudio del *locus* de cada copia de *FTF1* en la estirpe 4287 de *Fol* muestra que el gen *FTF1* se encuentra flanqueado por diferentes elementos transponibles, entre ellos los más numerosos son los ADN transposones: *Fot2*, *Fot3*, *Fot4*, *Fot5*, *Impala*, *Folyt1*, *Hornet1* y *mimp4*, aunque también se encuentra el retrotransposón *Marsu* flanqueando el *locus* *FOXG_16414*. Es preciso destacar que cercanas a los genes parálogos *FTF1* se encuentran regiones enriquecidas en genes relacionados con la virulencia de *F. oxysporum* como *ORX1*, que codifica una enzima oxidorreductasa secretada por *Fol* durante la colonización (Houterman *et al.*, 2007) o los genes efectores *SIX*, especialmente *SIX1* (Schmidt *et al.*, 2013).

Estas localizaciones indican que *FTF1* y algunos genes efectores como los *SIX* pertenecen a los mismos grupos de ligamiento, lo cual implicaría una evolución conjunta que consideramos crucial en el devenir de la colonización y susceptibilidad del hospedador.

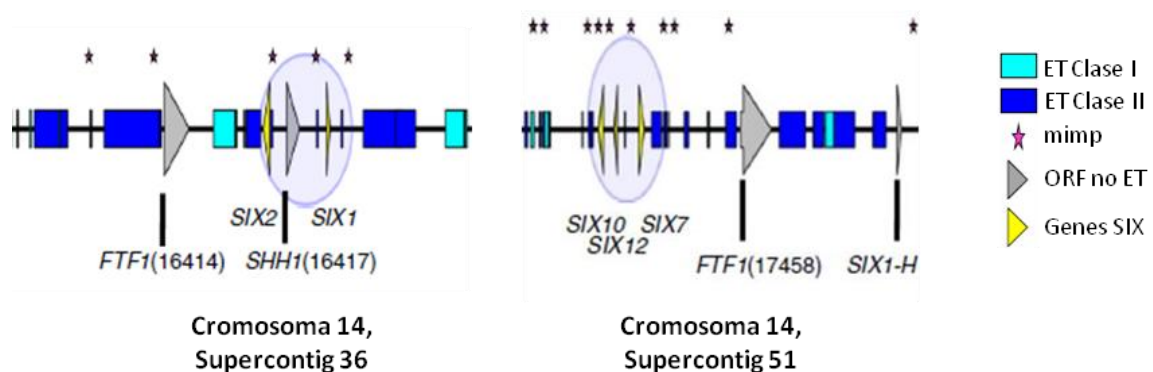


Figura 9. Detalle de las regiones subcromosómicas LS 2.36 y 2.51 enriquecidas en elementos transponibles y genes *SIX* flanqueando los *loci* de *FTF1* *FOXG_16414* y *FOXG_17458* en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. ET (Elemento transponible), ORF (*Open Reading Frame*), *FTF1* (*Fusarium Transcriptor Factor 1*) *SIX* (*Secreted In Xylem*), *SHH1* (*Salicylate Hydroxylase Homologue 1*). Modificado de Schmidt *et al.* (2013).

Cuestiones relevantes por dilucidar

Funcionalidad de las copias de *FTF1*

Debido al alto número de copias de *FTF1* presentes en el genoma de las distintas formas especiales y a efectos de determinar con precisión su papel en virulencia, resulta de crucial importancia determinar cuáles de estas copias son realmente funcionales o tienen una relación estrecha con la virulencia. Para ello nuestro grupo propone varias vías complementarias de estudio:

- Obtención de mutantes que expresen la proteína fluorescente GFP bajo el promotor específico de cada copia de *FTF1*. De este modo, y mediante microscopía láser confocal se puede seguir la expresión de una única copia de *FTF1* durante la colonización. Este método es más específico que el método de PCR a tiempo real en las formas especiales como *lycopersici*, donde el alto número de copias hace muy difícil el diseño específico de cebadores.

- Obtención consecutiva de mutantes delecionados en los diferentes genes *FTF1*. Esta opción es dificultosa, más cuantas más copias disponga la forma especial. Por ello, en el presente trabajo decidimos optar por la técnica del silenciamiento génico. Sin embargo, en estos últimos años se han descrito algunas técnicas que facilitarían este procedimiento. De este modo se podría aportar información exacta de la importancia en la virulencia de cada copia específica de *FTF1*:

- **Uso de la técnica FAST** (*Fluorescence Assisted Selection of Transformants*) (Vlaardingerbroek *et al.*, 2015). Esta técnica permite seleccionar los mutantes utilizando proteínas fluorescentes como marcadores de transformación mediante citometría de flujo. La ventaja de esta técnica es que se pueden usar varios marcadores de proteínas fluorescentes que serán detectadas por el citómetro. La eficiencia de reemplazo génico es similar a los marcadores tradicionales de resistencia a antibióticos (Vlaardingerbroek *et al.*, 2015).

- **Uso de un marcador reciclable.** Un marcador reciclable es aquel que puede ser escindido de manera autónoma. En este contexto el grupo de investigación del Dr. Luis González Candelas ha obtenido un plásmido binario capaz de escindir el marcador de resistencia a higromicina flanqueado por

secuencias específicas mediante la inclusión de una recombinasa en el plásmido pRF-HU2 (Frandsen *et al.*, 2008), cuya expresión es inducida mediante el aporte de xilosa en el medio de crecimiento (Selma-Lázaro y Gonzalez-Candelas, 2014).

Un problema más a tener en cuenta en la obtención de mutantes delecionados en *FTF1* es la baja eficiencia esperada de transformantes de recombinación homóloga, puesto que las secuencias flanqueantes, imprescindibles para efectuar el reemplazamiento génico, están repetidas en las regiones *LS* del genoma.

Papel de FTF1 en vías de señalización

Muchas cuestiones quedan abiertas en cuanto a la vía de señalización que activa la expresión de efectores en *F. oxysporum*. Al demostrar que FTF1 está implicado en dicha señalización, es interesante conocer qué genes, además de los descritos en este trabajo, están regulados por FTF1. La secuenciación masiva de ARN, o tecnología *RNA-seq*, permite conocer al detalle el nivel transcriptómico total en un momento dado. En el caso de *FTF1* la principal dificultad estriba en que este gen sólo se expresa durante la colonización del hospedador. Hemos diseñado una estrategia para abordar la caracterización del conjunto de genes regulados por FTF1, para lo cual se ha obtenido un mutante con expresión constitutiva de *FTF1* (*SP1PgpdA::FTF1.9*). La comparación de los transcriptomas obtenidos en medio de cultivo generados por este mutante y el tipo silvestre, sería el equivalente a comparar un mutante nulo en *FTF1* (tipo silvestre cultivado *in vitro*) y una estirpe funcional (el mutante constitutivo). También, mediante esta tecnología podemos comparar el transcriptoma de la estirpe silvestre (FOP-SP1) frente al de la estirpe silenciada en la familia génica *FTF* (*SP1FTFRNAi*) durante la colonización de los haces vasculares. Ambos experimentos son complementarios y permitirían obtener un conjunto de genes candidatos a ser regulados por FTF1. Asimismo, mediante un ensayo de retardo electroforético o ensayo EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) podría determinarse qué regiones

promotoras interaccionan directamente con FTF1, dilucidando la secuencia de ADN reconocida por el factor de transcripción.

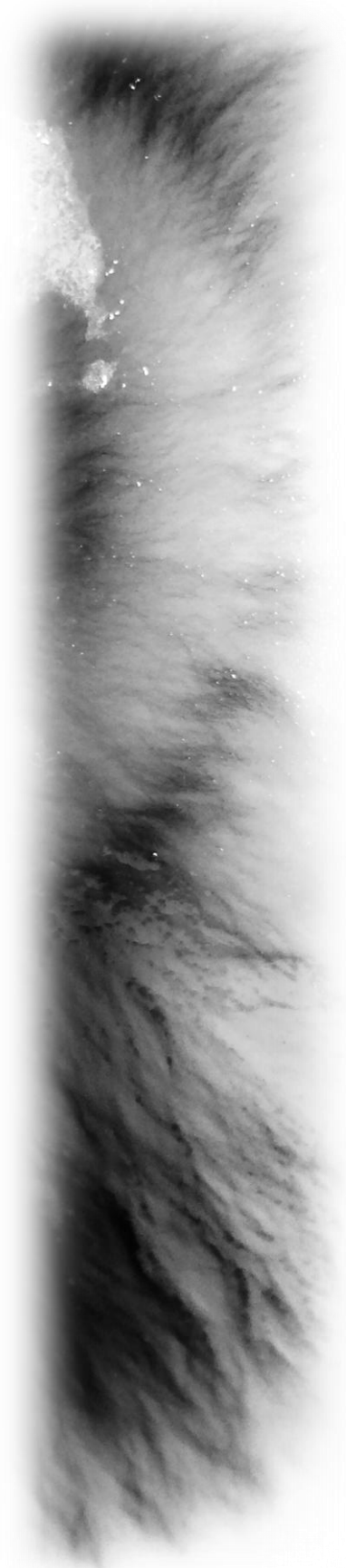
En recientes estudios mediante hibridación de los factores de transcripción FTF con una matriz de oligonucleótidos de generación sintética se ha propuesto la secuencia TGCCG, presente en las regiones enriquecidas en genes *SIX* de *Fol*, como motivo reconocido por estos factores de transcripción (van der Does *et al.*, 2014). La secuencia descrita en este trabajo, al ser de 5 nucleótidos no es suficientemente específica, pudiéndose encontrar en regiones promotoras de otros tantos genes (1 vez por cada 1024 pb de media), por lo que se hace necesario seguir ahondando en la regulación directa que desempeñan FTF1 y FTF2.

Otra estrategia válida sería la inmunoprecipitación de cromatina seguida de una secuenciación de ADN (*ChIP-Seq*). Realizamos varios experimentos al respecto, que resultaron fallidos debido a la dificultad de aseverar la producción constitutiva de FTF1 en fusión con la secuencia aminoacídica por triplicado del epítipo HA (hemaglutinina del virus de la gripe humana). Tras la correcta fusión del gen *FTF1* (*phasI4257*) con el promotor constitutivo *PgpdA* y el epítipo *HA* procedente del plásmido pFA6a-3HA y su transformación en la estirpe FOP-SP1, no fuimos capaces de verificar la traducción de la proteína FTF1-3HA, observando en el ensayo *Western Blot* diferentes bandas por debajo del peso molecular esperado. Quizá debido a una errónea traducción provocada por la fusión del epítipo 3HA o bien a una efímera vida celular de la proteína, sugiriendo de este modo que las bandas observadas fueran distintas fases de degradación. Sin embargo, no es descartable realizar en el futuro algunas variaciones sobre esta estrategia e intentar de nuevo el ensayo de *ChIP-Seq*.

Finalmente, sería interesante conocer la localización cromosómica de los genes regulados por FTF1, así como su distribución en otras estirpes de diferentes formas especiales, ya que pudieran resultar genes específicos de infección de una o unas pocas formas especiales. En el caso de *Fol* existen genes efectores específicos de la forma especial, como son *SIX2*, *SIX3* y *SIX5* alojados en regiones *LS* del genoma de la estirpe 4287. Los resultados en FOP-SP1 nos permitiría conocer si FTF1 es regulador de otros genes, como pudieran ser algunos posibles genes codificadores de efectores

específicos de la forma especial *phaseoli* alojados en las regiones *LS* o si bien, es un regulador exclusivo de genes implicados en la virulencia, ampliamente distribuidos en el complejo de especies *F. oxysporum*, tales como *SIX1* y *SIX6*.

La segunda aproximación sería conocer la presencia de esos genes en estirpes de la propia forma especial, tales como la estirpe poco virulenta FOP-SP4, carente de *FTF1*, *SIX1* y *SIX6*. En este trabajo hemos comprobado que tanto la expresión constitutiva como nativa de *FTF1* (*phas114257*) durante la colonización de *P. vulgaris* por FOP-SP4 no modifica la virulencia de esta estirpe, probablemente debido a la carencia de esta estirpe de efectores relevantes como *SIX1* o *SIX6*, así como otros aún desconocidos que intervengan en la vía de señalización de *FTF1* y sean decisivos en el aumento de la virulencia. De esta forma podría determinarse qué genes transferidos al genoma de una estirpe poco virulenta, tal como FOP-SP4, serían capaces de provocar un cambio en la virulencia; y cuáles transferidos a una estirpe no patógena, tal como AB82, fueran capaces de trocar la patogenicidad hacia *P. vulgaris*.



-Conclusiones-

Conclusiones

1. Existen diferencias notables entre las estirpes poco virulentas y muy virulentas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en la colonización del hospedador *Phaseolus vulgaris* L. La estirpe muy virulenta FOP-SP1 avanza hacia el cilindro vascular de la raíz principal más rápido que la estirpe poco virulenta FOP-SP4, lo que permite una diseminación más rápida por el sistema vascular de la planta infectada. Además, FOP-SP1 crece de manera masiva dentro de los haces xilemáticos, mientras que FOP-SP4 tiene un crecimiento en los mismos proporcionalmente menor al mostrado en el tejido parenquimático.

2. Las diferencias en la colonización se corresponden con un patrón de expresión específico de algunos de los factores de virulencia de hongos exclusivos de la estirpe muy virulenta FOP-SP1, como *FTF1*, *SIX1* y *SIX6*.

3. La respuesta de defensa de *P. vulgaris* depende del grado de virulencia de la estirpe de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con que es infectada. La respuesta sistémica adquirida (SAR) mediada por ácido salicílico es más temprana e intensa en la respuesta a la estirpe poco virulenta FOP-SP4 que hacia la estirpe muy virulenta FOP-SP1. En ambas interacciones la respuesta mediada por etileno y jasmonato es activada al comienzo de la infección.

4. La familia génica *FTF* (*Fusarium Transcriptor Factor*) se compone de dos genes: *FTF1* y *FTF2*. *FTF2* es un gen bien conservado en copia única en los genomas de hongos ascomicetos filamentosos del subfílum Pezizomycotina. *FTF1* es exclusivo de estirpes muy virulentas del complejo de especies *F. oxysporum*, presente en un número variable de copias alojadas en regiones *LS* (*Lineage Specific*) del genoma. El número variable de parálogos de *FTF1* se puede clasificar en 3 clases atendiendo a las características estructurales de las presuntas proteínas codificadas: *FTF1a*, *FTF1b* y *FTF1c*.

5. Se ha optimizado un método de silenciamiento génico altamente efectivo en *F. oxysporum*, sobre todo en las estirpes de la forma especial *phaseoli*. Este método se basa en la producción de ARNs bicatenarios, inductores de silenciamiento, transcritos a partir de dos promotores que flanquean, en orientaciones opuestas, al fragmento del gen cuya expresión se pretende atenuar.

6. Los transformantes silenciados en la familia génica *FTF* en las estirpes FOP-SP1 y 4287 presentan una acusada reducción de la virulencia sobre *P. vulgaris* y *S. lycopersicum*, respectivamente. Sin embargo, tanto la expresión constitutiva como la expresión inducida por el promotor nativo del gen *FTF1* en la estirpe poco virulenta FOP-SP4, no modifican la virulencia de esta estirpe.

7. El factor de transcripción *FTF1* es un regulador directo o indirecto de los genes efectores *SIX* (*Secreted in Xylem*) *SIX1* y *SIX6*, y del gen regulador *SGE1* (*Six Gene Expression 1*). La expresión constitutiva de *FTF1* en la estirpe FOP-SP1 incrementa la expresión de *SIX1*, *SIX6* y *SGE1*; mientras que el silenciamiento de la familia génica *FTF* en las estirpes FOP-SP1 y 4287 reduce la expresión de los genes *SIX1* y *SIX6*, en ambas formas especiales, y del gen *SGE1* en la forma especial *phaseoli*.

8. Los transformantes de la estirpe muy virulenta FOP-SP1 silenciados en la familia génica *FTF* muestran un patrón de colonización de *P. vulgaris* semejante al producido por las estirpes poco virulentas.



-Apéndice I-
Materiales y métodos

1. Organismos

Bacterias

Escherichia coli

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

Agrobacterium tumefaciens

Cepa AGL1 (AGLO *recA::bla* pTiBo542(Δ)T Mop+ CbR) (Lazo *et al.*, 1991). Se utilizó para la transformación de *Fusarium oxysporum* mediante el uso de vectores binarios.

Hongos

Todas las estirpes utilizadas en este trabajo, tanto silvestres como transformantes, de *Fusarium oxysporum* están descritas en las siguientes tablas:

<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>					
Estirpe	Origen	Genotipo	Patogenicidad/Virulencia	VCG	Raza
FOP-SP1	La Carrera (CIALE)	Silvestre	Patógeno muy virulento	167	6
FOP-SP4	La Carrera (CIALE)	Silvestre	Patógeno poco virulento	166	6
FOP-SP13	Villafranca (CIALE)	Silvestre	Parógeno supervirulento	169	6
AB82	El Barco de Ávila (CIALE)	Silvestre	No patógeno	167	6
SP1 <i>GFP</i>	FOP-SP1 (Este trabajo)	<i>PgpdA::sGFP</i>			
SP4 <i>GFP</i>	FOP-SP4 (Este trabajo)	<i>PgpdA::sGFP</i>			
SP1 <i>PFTF1::GFP</i>	FOP-SP1 (Este trabajo)	<i>PFTF1::sGFP</i>			
SP1 Δ <i>FTF2</i>	FOP-SP1 (V. Casado del Castillo)	Δ <i>FTF2</i>			
SP1 Δ <i>FTF2-FTF2</i>	SP1 Δ <i>FTF2</i> (Este trabajo)	Δ <i>FTF2</i> ; <i>FTF2</i>			
SP1 <i>FTFRNAi</i>	FOP-SP1 (Este trabajo)	<i>FTFRNAi</i>			
SP4- <i>FTF1</i>	FOP-SP4 (Este trabajo)	<i>FTF1</i>			
SP4 <i>PgpdgA::FTF1</i>	FOP-SP4 (Este trabajo)	<i>PgpdA::FTF1</i>			
SP1 <i>PgpdA::FTF1</i>	FOP-SP1 (Este trabajo)	<i>PgpdA::FTF1</i>			
SP1 <i>FTFRNAi-GFP</i>	SP1 <i>FTFRNAi</i> (Este trabajo)	<i>FTFRNAi</i> ; <i>PgpdA::sGFP</i>			

<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>					
Estirpe	Origen	Genotipo	Patogenicidad/Virulencia	VCG	Raza
287	J.Tello (INIA)	Silvestre	Patógeno	0030	2
4287FTFRNAi	4287 (Este trabajo)	FTFRNAi			

Tabla 4. Estirpes de *F. oxysporum* utilizadas en este trabajo.

Plantas

***Phaseolus vulgaris* L. (Judía)**

En los ensayos de infección se utilizaron semillas de la variedad Blanca Riñón procedentes de la comarca de El Barco de Ávila-Piedrahíta, provincia de Ávila (España).

***Solanum lycopersicum* L. (Tomate)**

En los ensayos de infección se utilizaron semillas comerciales de la variedad MoneyMaker (Quality seeds, Canadá).

2. Medios y condiciones de cultivo

Bacterias

Escherichia coli

Las condiciones y medios de cultivo fueron los descritos por Sambrook *et al.* (1989). La temperatura de incubación fue siempre de 37°C, tanto en medios sólidos como medios líquidos, donde los matraces fueron incubados en oscuridad y en agitación en un orbital Kühner 1SF-1-W a 250 r.p.m.

El medio comúnmente utilizado fue LB (Luria Bertani) para los experimentos de transformación y clonación. Este medio está compuesto por 0,5% de extracto de levadura (Difco), 1% de bacto triptona (Difco), 1% de NaCl y 1,5% de agar bacteriológico (Conda) en el caso de medio sólido.

Cuando se necesitó seleccionar colonias resistentes a kanamicina y ampicilina, se añadieron estos antibióticos al medio LB en una concentración de 50 µg/µL y 100 µg/µL respectivamente.

Agrobacterium tumefaciens

El medio comúnmente utilizado para su crecimiento fue LB, tanto sólido como líquido. La temperatura de incubación fue de 28°C en condiciones de oscuridad y la agitación de 250 r.p.m. en el caso de los cultivos líquidos. Otras condiciones de cultivo específicas para la transformación de *Fusarium oxysporum* mediante esta bacteria se detallan en el apartado 9 (Transformaciones).

Conservación a largo plazo

Todas las cepas bacterianas se guardaron en viales a -80°C en glicerol 30%.

Hongos. *Fusarium oxysporum*.

a) Medios sólidos

- **PDA** (*Potato Dextrose Agar*, Difco). A razón de 39 g/L de agua destilada y desionizada. Cuando fue necesario, este medio fue complementado con higromicina y fleomicina en concentraciones variables entre 50 y 100 µg/µL. Las distintas estirpes se incubaron a la temperatura de 25°C.

- **Agar-Agua**. A razón de 20 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada y desionizada. Este medio sólido fue utilizado para la consecución de microconidios uninucleados y germinados que, tras una incubación en este medio de 10-12 horas a 25°C de una dilución de esporas, se recogieron aisladamente mediante un punzón estéril bajo la observación en una lupa binocular Olympus SZX12. Por último, se transfirieron a una placa estéril con medio sólido PDA complementado con el antibiótico correspondiente.

b) Medios líquidos

- **PDB** (*Potato Dextrose Broth*, Difco). 24 g/L de agua destilada y desionizada. Se utilizó para crecimiento general y recogida de micelio. Las condiciones de cultivo fueron 25°C en agitación de 120 r.p.m. y luz constante durante 3-5 días.

- **Medio de esporulación GOX**. Utilizado para la obtención de esporas de forma abundante. Para su elaboración se añadió, por litro de agua destilada, 60 g de

sacarosa, 7 g de NaNO₃, 3 g de peptona (Difco), 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, y 0,5 g de KCl ajustado a pH 7 con NaOH (Hadas *et al.*, 2007).

Las condiciones de cultivo fueron 25°C en agitación de 120 r.p.m. y luz constante durante 3 días.

c) Conservación a largo plazo

Todas las estirpes se guardaron en viales a -80°C en glicerol 25% (V/V).

Germinación de plantas

Las semillas de las variedades de judía y tomate fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito 5% (V/V) durante 5 minutos y sucesivos lavados con agua estéril. Tras ello se sembraron en bandejas que contenían vermiculita (Projar, SA), un sustrato inerte que es favorable para la retención de la humedad y, por tanto, para garantizar la germinación de las semillas. Estas bandejas se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz – 8 horas de oscuridad. Tras 7-10 días, las plántulas estaban dispuestas para la inoculación con las estirpes de *F. oxysporum* y trasplante a diferentes medios descritos en el siguiente apartado, dedicado a este tipo de ensayos.

3. Ensayos de infección y cuantificación de síntomas.

Los ensayos para analizar la capacidad patogénica y el grado de virulencia de los aislados silvestres y sus transformantes tomaron como base el procedimiento descrito por Pastor-Corrales y Abawi (1987).

En primer lugar, se inocularon 50 mL de medio GOX con una estirpe de *F. oxysporum*. Tras la incubación durante 3 días a 25°C y 180 r.p.m. se aislaron las esporas, en su mayoría microconidios, filtrando el medio mediante una doble gasa estéril. Las esporas se lavaron dos veces con agua destilada (2 centrifugaciones de 5 minutos a 2.600 x g) y se cuantificaron mediante observación microscópica en una cámara de citometría *Thoma* al microscopio.

Se extrajeron las plántulas germinadas en vermiculita cuando presentaban al menos dos tercios de desarrollo de las hojas cotiledónicas (7-10 días tras la siembra). Las raíces se lavaron en agua destilada y se cortaron los ápices radiculares con una tijera desinfectada con el fin de homogeneizar el proceso de infección en todas las plantas al crear una lesión radicular.

Las raíces de las plantas fueron sumergidas en 100 mL de la suspensión de esporas durante 5 minutos. Para las plantas de judía la concentración de esporas fue de 10^6 esporas/mL, mientras que para las plantas de tomate la concentración fue de 10^7 esporas/mL (Rep *et al.*, 2004). Las plantas fueron replantadas en macetas de 0.60 L en una mezcla de tierra-vermiculita en relación 3:1.

Las judías se cultivaron en el invernadero, preferencialmente entre los meses comprendidos entre marzo y octubre con una temperatura media controlada de 25°C, humedad relativa entre el 60-70%, y fotoperiodo ajustado al menos a 12 horas de luz, cuando las condiciones ambientales externas fueron desfavorables. Los tomates se cultivaron tanto en el invernadero, con las condiciones anteriores, como en cámaras de crecimiento con una temperatura de 25°C, humedad relativa de 75% y fotoperiodo de 16 horas de luz – 8 horas de oscuridad. En ambos casos las plantas fueron regadas con agua corriente.

Los ensayos en medio hidropónico realizados en las plantas de judía se desarrollaron en cámaras de crecimiento con las mismas condiciones previamente descritas para el cultivo de plantas de tomate. El sustrato en este caso fue el medio líquido PGM (*Plant Growth Medium*) (Yedidia *et al.*, 1999) contenido en tubos *Falcon* de 50 mL de volumen, forrados con papel de aluminio, donde las raíces de cada plántula fueron sumergidas.

Cuantificación de síntomas en *Phaseolus vulgaris*

En el caso de las plantas de judía cultivadas en invernadero, la sintomatología producida por *Fusarium* se evaluó mediante tres aproximaciones: escala CIAT, masa de la parte aérea de la planta y manchas en haces vasculares.

a) Escala CIAT

Descrita en Pastor-Corrales y Abawi (1987). Es una medición en la que se calcula el porcentaje de hojas de la planta que muestran síntomas de clorosis, amarilleamiento, marchitez, y/o caída prematura. A este porcentaje se le asigna un número del 1 al 9 en la manera que indica la siguiente tabla:

Índice CIAT	Porcentaje 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 5. Escala CIAT. Modificado de Alves-Santos *et al.* (1999); Pastor-Corrales y Abawi (1987).

Por medio de esta aproximación, las plantas se evaluaron semanalmente durante cuatro o cinco semanas, considerándolas como:

- **Resistentes:** Plantas con índice entre 1 y 3.
- **Susceptibles:** Plantas con índice superior a 3.

Además, se estableció una clasificación de las estirpes según su virulencia en la variedad de judía Blanca Riñón, conforme al siguiente criterio de Alves-Santos *et al.* (2002a):

- **Patógenos muy virulentos:** Provocan lesiones en la judía en etapas muy tempranas de la infección. El índice en la cuarta o quinta semana es 9. La planta muere.
- **Patógenos poco virulentos:** Provocan susceptibilidad en la planta pero en menor grado. No superan el índice 8 al término del ensayo. La planta no muere.

A partir de estos datos se definió el índice DPR (*Disease Progression Rate*), que se obtiene mediante la fórmula $DPR = \sum_i X_i/n$, donde X_i representa la severidad de la

infección según la escala CIAT (de 1 a 9) y n representa el número de semanas transcurridos tras la inoculación (García-Sánchez *et al.*, 2010).

b) Masa de la parte aérea de la planta

Las plantas fueron evaluadas para calcular el índice CIAT Transcurridas cuatro semanas desde el momento de la inoculación. Tras ello, fueron cortadas con una tijera en la zona del hipocotilo a ras de suelo, y pesados todos los tejidos aéreos en una báscula.

c) Manchas en haces vasculares

Transcurridas cuatro semanas, y tras la evaluación para el cálculo del índice CIAT y la masa aérea de la planta, se observaron macroscópicamente las manchas necróticas que mostraba el hipocotilo en el corte transversal que acababa de producirse. De esta manera, se asignó un valor en una escala numérica de 0 a 4 según los síntomas presentados: 0, sin síntomas; 1, uno o dos haces vasculares marrones en el hipocotilo; 2, más de tres haces vasculares de color marrón; 3, observación de un anillo de color marrón al estar todos los haces vasculares de este color; 4, planta muerta, hipocotilo seco.

Para plantas cultivadas en medio hidropónico en cámaras de crecimiento se estableció otro modelo de cuantificación de síntomas, puesto que el crecimiento y desarrollo de la planta no era el mismo que en las condiciones de invernadero. Este modelo se basó en una escala numérica entre 0 y 4 que cuantificaba el grado de síntomas externos (hojas cloróticas) e internos (lesiones necróticas) que mostraban las plantas: 0, planta sana, sin síntomas de clorosis ni necrosis; 1, planta sin hojas cloróticas pero ligeras lesiones necróticas; 2, plantas con algunas hojas cloróticas y lesiones necróticas en el sistema vascular del cuello de raíz; 3, plantas con casi todas las hojas cloróticas o muertas y lesiones necróticas extensas en el cuello de raíz y sistema vascular; 4, planta muerta.

Cuantificación de síntomas en *Solanum lycopersicum*

La evaluación de la sintomatología producida en tomate por la infección con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizó básicamente utilizando dos métodos: cuantificación de la masa de la parte aérea de la planta y cuantificación de las manchas necróticas en sus haces vasculares (Ma *et al.*, 2010; Rep *et al.*, 2004; Rep *et al.*, 2005).

a) Masa de la parte aérea de la planta

Transcurridas tres semanas tras la inoculación, las plantas fueron cortadas con unas tijeras a ras de suelo, a nivel de hipocotilo, y fueron pesadas en una báscula.

b) Manchas en haces vasculares

Transcurridas tres semanas, la evaluación se realizó de la misma manera que en el caso de las plantas de judía. Se asignó a los síntomas un valor de una escala numérica comprendida entre 0 y 4. Donde 0, sin síntomas; 1, zona del hipocotilo abultada o doblada; 2, uno o dos haces vasculares marrones; 3, al menos dos haces vasculares marrones y distorsión en el crecimiento (fuerte flexión del tallo y desarrollo asimétrico); 4, todos los haces vasculares de color marrón, planta marchita y muy pequeña o muerta.

4. Análisis microscópicos

Las plantas inoculadas con las estirpes de *F. oxysporum* y los controles negativos (inoculación sin esporas) se mantuvieron en cultivos hidropónicos, examinándose todos los días desde la inoculación, durante un periodo de veintiún días.

Para la descripción de la estructura histológica, las secciones se fijaron e incluyeron tal como se describe en Jiménez *et al.* (2007). Después se tiñeron con azul de toluidina al 0,1% (m/V) en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 6,8.

Para el análisis CLSM (*Confocal laser scanning microscopy*), o microscopía láser confocal, las raíces e hipocotilos de las plantas se lavaron en agua destilada estéril. Se

cortaron manualmente con una cuchilla de afeitar secciones transversales de la planta o muestras longitudinales de 1 mm de grosor de los siguientes tejidos: pelos radiculares, raíz principal, cuello de raíz e hipocotilo. Los tejidos vegetales se tiñeron durante 15 minutos con una gota de yoduro de propidio (10 mg/mL, Sigma). El exceso de yoduro de propidio se eliminó lavando la muestra varias veces con agua destilada estéril. Las muestras se colocaron en un portaobjetos sumergidas en glicerol 50% (V/V). 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 de la proteína GFP se detectó en el espectro comprendido entre 495 y 520 nm, mientras que la autofluorescencia de la pared celular de la planta junto con la tinción de yoduro de propidio se detectó en el espectro comprendido entre 595 y 680 nm.

5. Obtención de ácidos nucleicos

ADN genómico de hongo y planta. Método CTAB

El protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue elaborado por Murray y Thompson en 1980 (Murray y Thompson, 1980) y publicado posteriormente, en 1987, por Wagner *et al.* (1987). El método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales y hongos, y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos. El procedimiento que se describe a continuación es una modificación de este método.

El primer paso para la extracción de ADN fue homogeneizar completamente el tejido. Para ello se utilizaron dos métodos:

- **Homogeneización en nitrógeno líquido:** Tanto el tejido de la planta, como el micelio de *F. oxysporum* recogido en una doble gasa estéril por filtración del medio de cultivo, fueron pulverizados en un mortero con nitrógeno líquido. Alrededor de 250 mg de homogeneizado fueron recogidos en tubos *ependorf*. Estas muestras, siempre inmersas en nitrógeno líquido, se guardaron a -80°C hasta su uso.

- **Homogeneización tras liofilización:** Se aplicó exclusivamente a muestras fúngicas. En este caso, un trozo de micelio fue transferido con unas pinzas estériles desde el medio de crecimiento hasta un tubo *ependorf*. Tras agujerear el tubo *ependorf* mediante un punzón para que pudiera producirse el vacío en el interior del tubo, las muestras se introdujeron en un liofilizador (Virtis advantage) conectado a una bomba de vacío (Savant ValuPump VLP120) durante 4-8 horas. El micelio deshidratado se pulverizó fácilmente mediante varillas de vidrio estériles. Este tipo de homogeneización se realizó cuando se necesitaba analizar múltiples colonias de *F. oxysporum*.

Una vez recuperado el tejido homogeneizado en tubos *ependorf*, se añadieron 800 μ L de Solución de Extracción de ADN, que es una mezcla en relación 1:1:0,4 de los siguientes compuestos: Solución de Lisis Nuclear (200 mL Tris 1 M pH=7,5, 100 mL EDTA 0,5 M pH=8, CTAB 20 g, ajustando hasta 1 L con agua destilada), Solución de Aislamiento de ADN (Sorbitol 63,78 g, Tris 12,10 g, EDTA 1,68 g en 1 L de agua destilada), y N-laurilsarcosina 5 % (m/V). Las muestras se incubaron durante una hora en esta solución a 65°C, agitándose manualmente por inversión cada 15 minutos. Se añadieron 750 μ L de cloroformo isoamílico (24:1) y se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 x g tras haber sido mezcladas manualmente mediante inversiones continuas. Después se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo *ependorf*. El ARN fue eliminado añadiendo 1 μ L de ARNasa (Roche) e incubando la muestra a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo 600 μ L de isopropanol y 150 μ L de acetato amónico 7,5 M, incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando las muestras durante 10 minutos a máxima velocidad (16.000 x g) en una micrófuga *ependorf* de poyata. Tras comprobar la existencia de precipitado, éste se lavó al menos dos veces con etanol 70 % (V/V) con centrifugaciones a máxima velocidad de 5 minutos de duración. Finalmente el ADN fue resuspendido en 50-100 μ L de agua Milli-Q.

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

Según las circunstancias, se utilizaron tres métodos diferentes de extracción:

a) Lisis alcalina

Fue utilizado de manera rutinaria para la comprobación de posibles colonias bacterianas transformadas. El protocolo es una modificación del manual del kit comercial Plasmid Mini-Preps Using (Promega). El ADN resultante no es de alta pureza, pero es suficiente como para llevar a cabo reacciones de PCR y digestiones enzimáticas.

El procedimiento consistió en centrifugar 2-4 mL de cultivo bacteriano de a 3.000 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 250 µL de Solución de Resuspensión (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 10 mM, RNasa A 100µg/mL). Tras una vigorosa agitación en *vortex*, se añadieron 250 µL de Solución de Lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1% (m/V)), incubándose a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 250 µL de Solución de Neutralización (Acetato de potasio 1,32 M a pH 4,8) y se centrifugó a máxima velocidad (16.000 x g) durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* al que se añadieron 750 µL de isopropanol. Se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos para precipitar el ADN. Finalmente el ADN plasmídico se resuspendió en 50 µL de agua Milli-Q estéril.

b) Preparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin® Plasmid

Cuando se requirió un alto grado de pureza del ADN, como por ejemplo, para la construcción de plásmidos o para reacciones de secuenciación, se utilizó el kit de minicolumnas comerciales NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante y partiendo de cultivos bacterianos de 2-4 mL.

c) Preparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoBond® Xtra Midi

Fue utilizado cuando se requirió un alto grado de pureza en la obtención de gran cantidad de ADN (por ejemplo, para la purificación de plásmidos de bajo número de copias que pretendían usarse como vectores de clonación). Se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y partiendo de cultivos bacterianos de 100 mL.

ARN total

a) Método TRIzol reagent.

Este método se utilizó cuando el ARN a extraer fue de procedencia fúngica. Tras la obtención del micelio homogeneizado, se añadió 1 mL de TRIzol reagent (Invitrogen), procediendo a la extracción de ARN según las recomendaciones del fabricante, e introduciendo algunos cambios para un mayor rendimiento y pureza en nuestro sistema. Una vez añadido el reactivo TRIzol reagent, se homogeneizó en un *vortex* y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo al que se añadieron 200 µL de cloroformo. Se mezcló mediante una agitación vigorosa en el *vortex* durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 x g, transfiriéndose de nuevo el sobrenadante a un tubo *ependorf* al que se añadieron 250 µL de isopropanol y 250 µL de solución de precipitación (Citrato sódico 0,8 M y NaCl 1,2 M). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x g. Los ácidos nucleídos precipitados se lavaron con etanol al 75 % (V/V) diluido en agua Milli-Q estéril tratada con DEPC 1% (V/V), al menos dos veces, con centrifugaciones a 7.500 x g durante 5 minutos. Tras los lavados se añadieron 50 µL de agua Milli-Q 1% (V/V) DEPC y se incubó durante 10 minutos a 60°C con el fin de resuspender el precipitado. Durante todo el proceso de extracción, las muestras estuvieron convenientemente incluidas en hielo, siendo de 4°C la temperatura de cada centrifugación.

Tras la extracción de los ácidos nucleicos por el método TRIzol reagent, se trató con ADNasa utilizando el kit comercial Turbo DNA-free™ (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

Se utilizó prioritariamente cuando el ARN a extraer procedía de la interacción hongo-planta. Se utilizaron 30 mg de homogeneizado y se siguieron las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Para estimar la pureza y la concentración de ambas moléculas se midió la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). La razón A_{260}/A_{280} indica la pureza del ácido nucleico respecto a las proteínas, que es 1,8 para el genoma de *E. coli* y 2,0 para el ARN total. Estas razones pueden variar ligeramente dependiendo del contenido G-C del organismo.

Para cerciorar la estimación espectrofotométrica se analizaron alícuotas de las preparaciones mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 8, Transformaciones) (0,6 % para ADN genómico y 1 % para ARN), calculando el tamaño y concentración con referencia a marcadores de peso molecular de concentraciones conocidas.

6. Vectores de clonación

pGEM®-T Easy

Este vector de clonación se ha utilizado en la clonación de fragmentos de PCR. Se comercializa de forma lineal y su tamaño es de 3.015 pb. Dispone de una desoxitimidina 3' terminal en ambos extremos. Esta característica mejora la eficiencia de clonación de los amplicones, ya que las polimerasas termoestables frecuentemente añaden una única desoxiadenosina en los extremos 3' en los productos de PCR. Como

marcadores seleccionables por fenotipo, posee el gen de resistencia a ampicilina y la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*) cuya inactivación insercional permite la identificación fenotípica por color (colonias blancas frente a colonias azules en *E. coli*) al añadir al medio de cultivo sólido LB el sustrato y el inductor de la enzima: X-gal e IPTG, respectivamente. El plásmido dispone del origen de replicación del bacteriófago filamentoso f1. Para determinar la secuencia del fragmento clonado presenta, en ambos flancos de la multidiana de restricción, secuencias para el reconocimiento de los oligonucleótidos *universal* y *reverso*.

Vectores USER

La técnica de clonación USER (Uracil-Specific Excision Reagent) Friendly™ se basa en la escisión de un nucleótido de uridina en los extremos del inserto generado mediante PCR. El nucleótido de uridina forma parte de uno de los nueve pares de bases que se añaden al extremo 5' de cada cebador. Tras la amplificación por PCR con los cebadores, la escisión de los nucleótidos de uridina por medio de la enzima USER (endonucleasa VIII y Uracil-ADN glicosilasa) genera una cadena mellada de nueve nucleótidos en los extremos 3' del amplicón. Los extremos 3' sobresalientes en el vector de clonación son generados por restricción con las enzimas *PacI* y *Nt.BbcCI*, que genera la mella homóloga (Frandsen *et al.*, 2008).

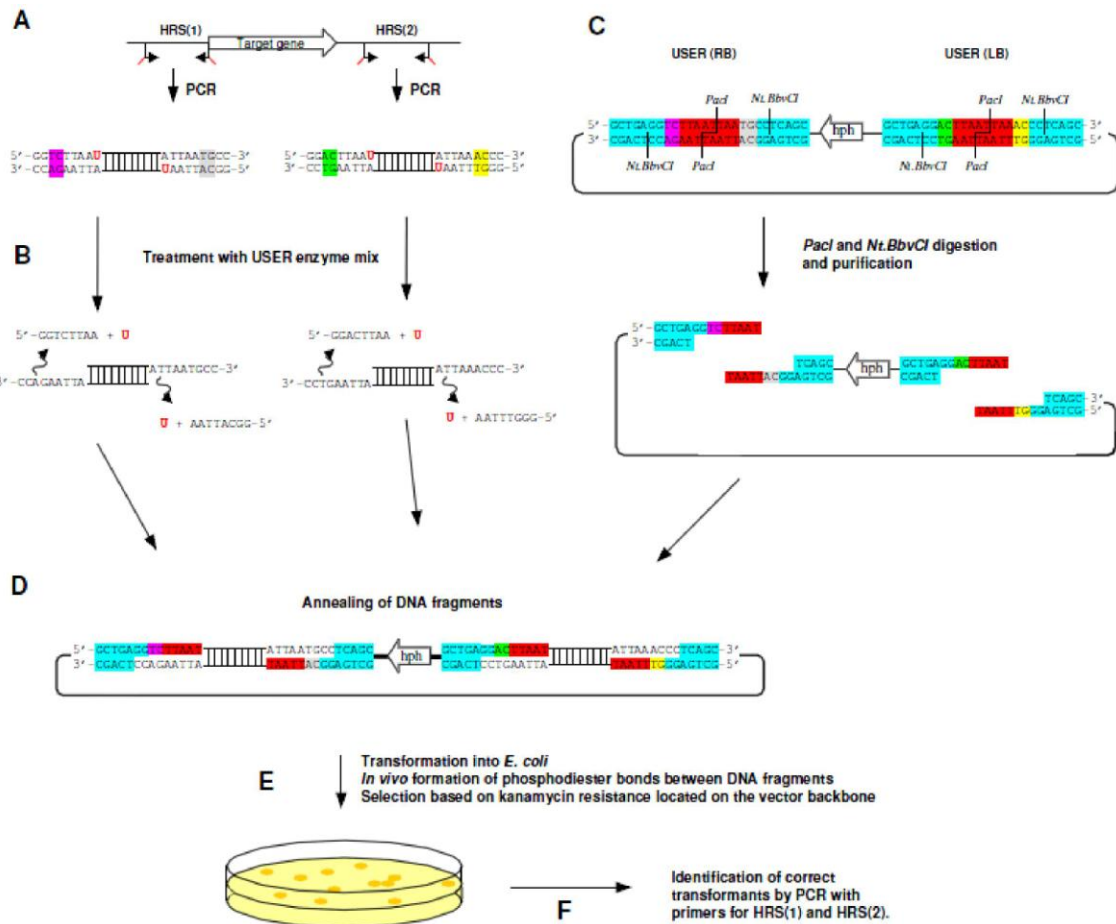


Figura 10. Estrategia de clonación USER Friendly para la construcción en un paso de un vector de reemplazamiento génico. **A**, amplificación de dos secuencias de recombinación homóloga (*HRS*) con cebadores que contienen en el extremo 5' una desoxiuridina. **B**, tratamiento de los amplicones con la enzima USER. **C**, diseño del vector USER para la sustitución dirigida de genes en hongos con dos sitios de clonación USER únicos (*LB* y *RB*). **D**, hibridación de los dos fragmentos de ADN vector con ambos insertos. **E**, transformación en *E. coli*, donde se generan las uniones covalentes de los insertos al vector. **F**, detección de transformantes correctos mediante PCR. (Frandsen *et al.*, 2008).

Los plásmidos que se pueden utilizar con esta técnica están descritos en Frandsen *et al.* (2008). Todos ellos son binarios, contienen las regiones de reconocimiento para la inserción conocidas como *Left Border* (*LB*) y *Right Border* (*RB*), y confieren resistencia bacteriana a la kanamicina y fúngica a la higromicina al portar el gen de la higromicina B fosfotransferasa (*hph*). Dependiendo del objetivo concreto, se utilizaron los siguientes:

- **pRF-HU** y **pRF-HUE**: Diseñados para integraciones ectópicas en el genoma del hongo. Están compuestos por 6.336 y 8.709 pb, respectivamente. La gran diferencia entre los dos radica en que el plásmido pRF-HUE porta el promotor de

expresión constitutiva del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*PgpdA*) procedente de *Aspergillus nidulans*, lo cual permite la expresión constitutiva del gen insertado.

- **pRF-HU2:** De 6.323 pb, está diseñado para la clonación dirigida en un solo paso de dos amplicones de PCR que permitan el reemplazamiento génico en hongos filamentosos.

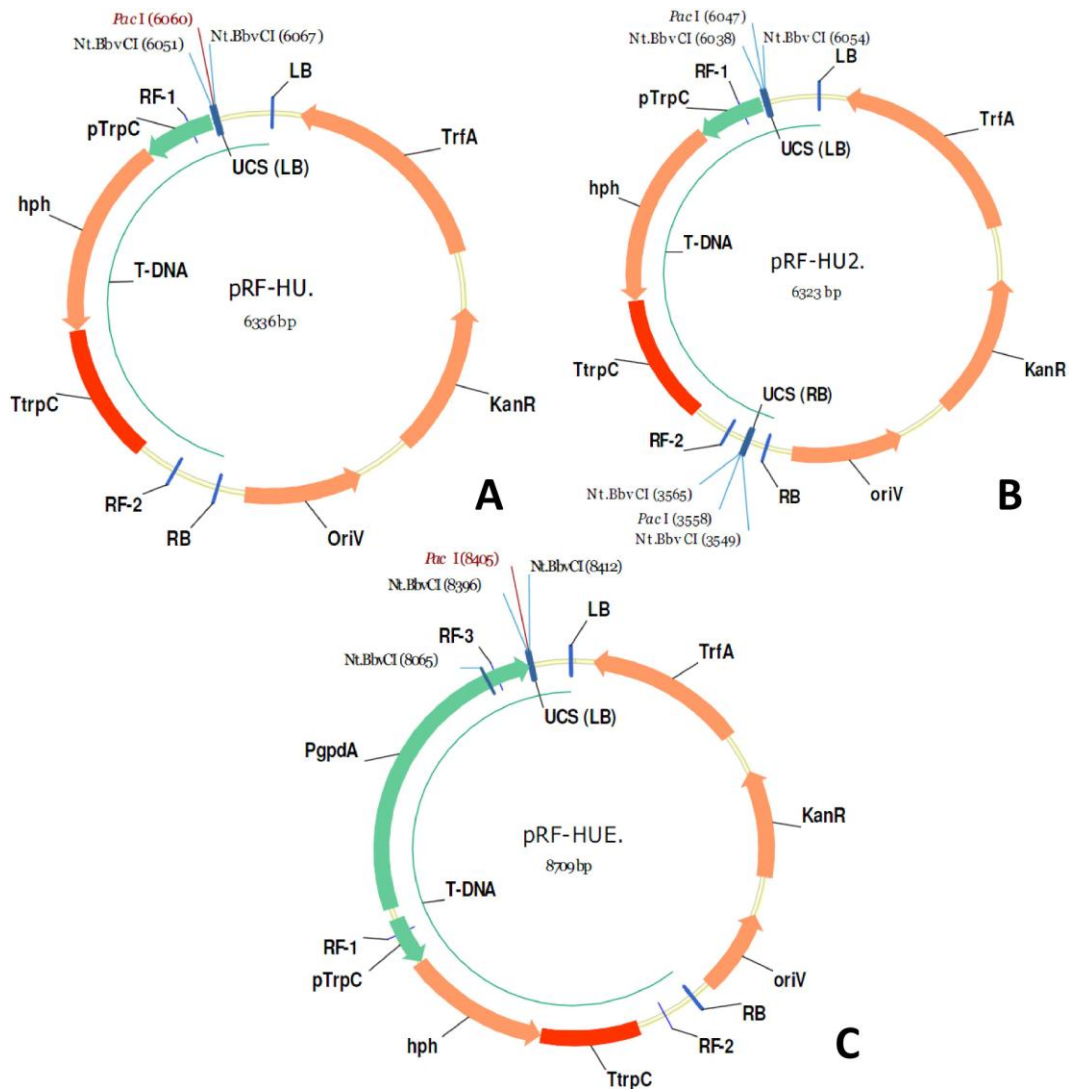


Figura 11. Vectores utilizados en la clonación USER Friendly. A, pRF-HU (6.336 pb). B, pRF-HU2, (6.323 pb). C, pRF-HUE (8.709 pb). Modificado de Frandsen *et al.* (2008).

Otros vectores utilizados

- **gGFP:** Tiene un tamaño de 9.240 pb. Fue diseñado para la expresión constitutiva de *GFP* en hongos filamentosos mediante transformación de protoplastos (Maor *et al.*, 1998; Sukno *et al.*, 2008). Fue utilizado para amplificar el gen *sGFP* junto con el promotor constitutivo *PgpdA* e introducirlo en un vector binario para su transformación en *F. oxysporum*.

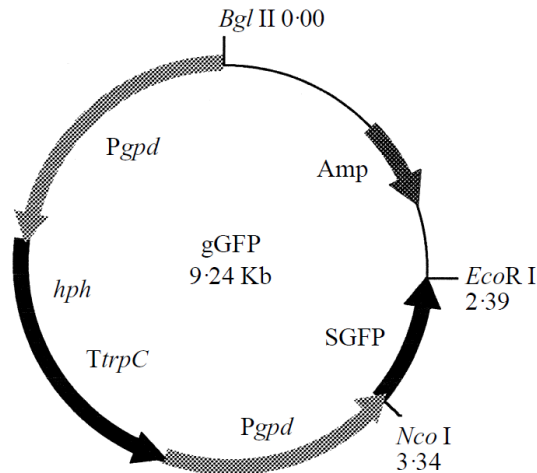


Figura 12. Vector gGFP. Tamaño de 9.240 pb. El gen *sGFP* se encuentra fusionado con el promotor constitutivo *PgpdA* de *A. nidulans*. (Maor *et al.*, 1998).

- **pJL43-RNAi:** Plásmido de 6.406 pb que incluye un *cassette* de expresión de ARN de doble cadena para el silenciamiento génico. Para ello presenta un único sitio de clonación *NcoI* flanqueado por dos secuencias promotoras orientadas de forma invertida: el promotor constitutivo *PpbcC* procedente de *Penicillium chrysogenum* y el promotor constitutivo *PgpdA* de *Aspergillus nidulans*. Adicionalmente, el vector pJL43-RNAi contiene un gen de resistencia a fleomicina (gen *ble*), bajo el control constitutivo del promotor de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*) de *Aspergillus awamori* (Ullán *et al.*, 2008). Estos dos *cassettes* fueron amplificados mediante PCR y utilizados para generar vectores binarios y obtener mutantes silenciados con resistencia a fleomicina en *F. oxysporum*.

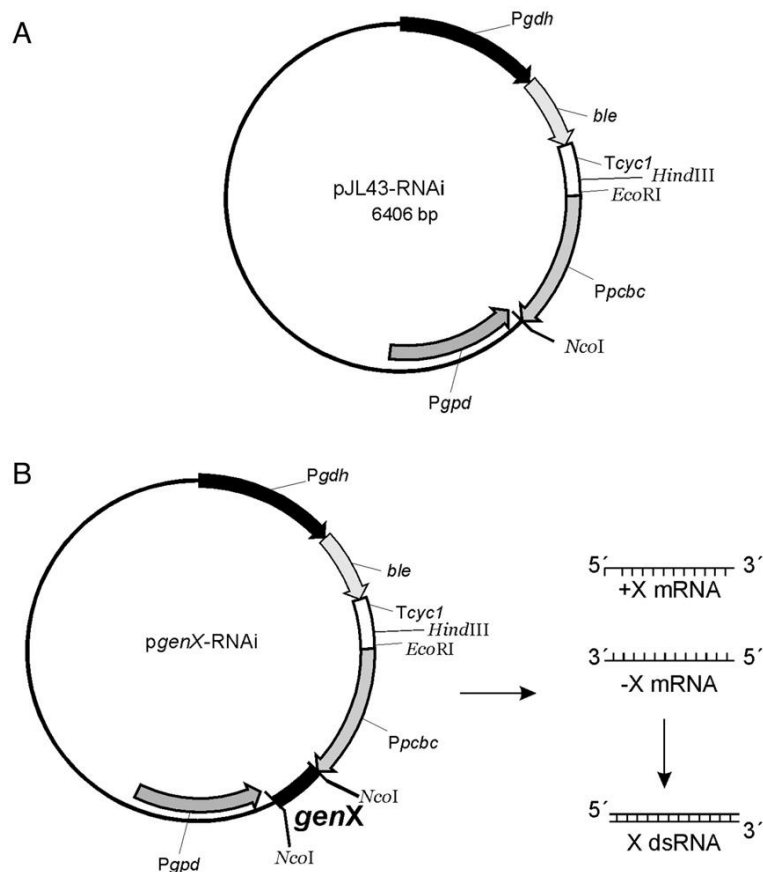


Figura 13. Vector de silenciamiento pJL43-RNAi y diagrama de formación de ARNs. **A**, mapa de restricción del plásmido pJL43RNAi que contiene un *cassette* de expresión de ARNs con un único sitio de restricción *NcoI*. **B**, diagrama de la producción de ARNs procedente de un gen de interés. (Ullán *et al.*, 2008).

7. Manipulación de ácidos nucleicos

Tratamiento con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN genómico y plasmídico con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo de forma rutinaria para la construcción de nuevos vectores y la caracterización física de éstos, así como de otro tipo de fragmentos de ADN. Las diversas enzimas de restricción fueron proporcionadas por las casas comerciales Roche y Takara, utilizándose según las normas del fabricante, que incluían el uso de tampón salino específico a concentración 1X, y las condiciones de la incubación, generalmente a 37°C de temperatura y con una duración entre una y dieciséis horas, dependiendo de la cantidad y pureza de ADN en la reacción.

Las enzimas USER y *Nt.BbvCI* fueron proporcionadas por la casa comercial New England Biolabs. La peculiaridad de estas enzimas es que son capaces de mellar la hebra del ADN, obteniendo extremos sobresalientes. En el caso específico de la enzima USER las condiciones de incubación fueron de 37°C durante 20-30 minutos para mellar los amplicones producidos por PCR.

Ligaciones

La ligasa DNA T4 cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre terminaciones yuxtapuestas de 5'-fosfato y 3'-hidroxil en el ADN de doble cadena con extremos romos o cohesivos. Esta enzima requiere ATP como cofactor de la reacción. La casa comercial Roche suministra junto con la enzima un tampón 10X que incluye ATP (Tris HCl 660 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 50 mM, ATP, a pH 7,5). Las incubaciones se realizaron a 16°C durante 12-20 horas. Como normal general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo en volúmenes de 5-20 µL con las diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1 µL de la enzima a una concentración de 1 U/µL.

Rellenado de extremos 5' sobresalientes

La enzima Klenow Fragment de la casa comercial Thermo Scientific se utilizó para rellenar los extremos 5' sobresalientes, produciendo un extremo romo en los fragmentos de ADN tratados. Su uso se limitó a la construcción de plásmidos. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para su uso: incubación durante 10 minutos a 37°C de una mezcla que comprendía la enzima, el buffer específico al 1X, dNTPs 0,05 mM, agua libre de nucleasas y el fragmento de ADN linear a tratar (0,1-4 µg). Tras ello, la enzima fue inactivada durante 10 minutos a 75°C.

8. Electroforesis

Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa, preparados según los requerimientos, en porcentajes entre 0,5 y 2,5 (m/V) en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM). Se utilizaron cubetas horizontales de 15 y de 30 cm de largo con tampón de electroforesis TAE 1X. Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga (azul de bromofenol 0,1% (m/V), xilén cianol FF 0,1% (m/V), glicerol 30% (V/V)) en proporción 5:1 (V/V). De esta manera el ADN entraba correctamente en los pocillos y se podía seguir el estado de la electroforesis por la posición relativa de los colorantes. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa incluyendo una muestra con un patrón comercial de marcadores de tamaños conocidos (1 kb plus, Invitrogen). A continuación, se aplicó un voltaje variable entre 6-10 V/cm según el rango de tamaño a resolver y la cantidad de ADN. Una vez realizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 15 minutos en un baño de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en TAE 1X, y posterior lavado durante 10 minutos con agua destilada. El ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta ($\lambda=260$ nm), capturándose las imágenes en el equipo de visualización Alphamager MINI (Protein Simple).

Recuperación de ADN a partir de fragmentos de agarosa.

A fin de obtener un alto rendimiento de purificación, se tuvieron precauciones previas en la electroforesis, como fue el bajo porcentaje de agarosa, 0,7-0,5% (m/V) según el tamaño del fragmento a purificar, bajo voltaje y alta resolución para distinguir la fracción deseada. Tras la electroforesis, el fragmento de agarosa donde se alojaba el ADN fue cortado con una hoja de bisturí estéril. Acto seguido, la purificación del fragmento de ADN del bloque de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones recomendadas en el manual.

9. Transformaciones

Transformación de *Escherichia coli* mediante choque térmico

Preparación de células competentes

Las transformaciones mediante choque térmico de *E. coli* se realizaron utilizando células competentes obtenidas según el método descrito por Hanahan *et al.* (1995). Para ello se realizó un preinóculo con una colonia de la cepa DH5 α en 5 mL de LB a 200 r.p.m. y 37 °C durante 16 horas. Este preinóculo fue añadido a 500 mL de medio Ψ (Psi) cuya composición para un litro es de 20 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 0,745 g de MgSO $_4$; y 1 L de agua destilada. El pH se ajustó a 7,6 con KOH 10 N. La incubación fue a 37°C y 200 r.p.m. hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a $\lambda=550\text{nm}$ de 0,48. Las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación a 960 x g durante 5 minutos. Tras ello, se resuspendieron en 150 mL de TFB1 a 4°C. La composición de la solución acuosa TFB1 es de 12,092 g/L de RbCl $_2$, 6,3 g/L de MnCl $_2$, 2,9 g/L de acetato potásico, 1,1 g/L de CaCl $_2$, 15% (V/V) de glicerol, ajustando con ácido acético 0,2 M el pH a 5,8, y esterilizando por filtración. Tras la completa resuspensión de las células mediante una agitación manual suave en la solución TFB1, se incubaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron nuevamente durante 5 minutos a 1.000 x g y a 4°C. Se resuspendieron en 20 mL de TBF2 a 4°C. La composición de la solución acuosa TBF2 es de 2,1 g/L MOPS; 1,2 g/L de RbCl $_2$; 8,3 g/L CaCl $_2$; 15% (V/V) de glicerol, ajustando con NaOH 10 M el pH a 7, y esterilizando por filtración. Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo durante 15 minutos y se repartieron en alícuotas de 100 μL para su conservación a -80°C.

Procedimiento

Las alícuotas de 100 μL de bacterias competentes se descongelaron en hielo. 50 μL de células competentes se utilizaron en la mezcla con el ADN plasmídico, cuya cantidad estuvo comprendida entre 10 y 200 ng, añadiéndose volúmenes inferiores a 20 μL . La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos, tras los cuales las células fueron sometidas a choque térmico: 50 segundos a 42°C seguido de 2 minutos en hielo. Se añadieron 450 μL de medio LB y las células fueron incubadas durante 75

minutos a 37°C y 300 r.p.m., tiempo suficiente para que las bacterias transformadas sintetizaran las proteínas responsables para su selección, como son las que confieren resistencia a antibióticos. Transcurrido este tiempo las células se incubaron en medio LB sólido selectivo durante 16 horas, donde se pudo apreciar el crecimiento de las bacterias transformadas en forma de colonias diferenciadas.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación

Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó una colonia de la cepa AGL-1 de *A. tumefaciens* en 100 mL de LB complementado con los antibióticos Rifampicina (25 µg/mL) y Carbenicilina (100 µg/mL). Se incubó durante 16 horas a 30°C con una agitación vigorosa de 200 r.p.m. Al día siguiente se centrifugaron las células a 3.800 x g durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el sedimento celular en 50 mL de glicerol 10% (V/V) a 4°C. Este lavado se repitió en tres ocasiones. Finalmente, se resuspendieron las células en 1 mL de glicerol 10% (V/V) a 4°C y se repartieron en alícuotas de 40 µL que se conservaron a -80°C.

Procedimiento

Para la electroporación se añadieron entre 50 y 200 ng de ADN, nunca un volumen superior de 4 µL, a 40 µL de células electrocompetentes. Para realizar la electroporación se utilizó un electroporador Bio-Rad gene-pulserTM. Se colocó la mezcla en una cubeta de electroforesis estéril y fría. El pulso fue de 8-12 ms, 2.500 V, 25 µF y 400 Ω. La mezcla se recuperó añadiendo 1 mL de LB en la cubeta de electroporación y transfiriendo la mezcla a un tubo *ependorf* estéril. Las células se incubaron durante 3 horas a 28°C y 250 r.p.m., tiempo suficiente para que las bacterias se encontraran metabólicamente activas. Transcurrido este tiempo las células se incubaron en medio LB sólido selectivo (Kanamicina 50 µg/mL) durante al menos 48 horas, donde se pudo apreciar el crecimiento de las bacterias transformadas en forma de colonias diferenciadas.

Transformación de *Fusarium oxysporum*

Se siguió el procedimiento propuesto por Mullins *et al.* (2001). Una colonia de *A. tumefaciens* transformada con el vector binario se cultivó a 28°C con 250 r.p.m. de agitación y en oscuridad durante 48 horas en un cultivo líquido de 2 mL de Medio Mínimo (MM) complementado con Kanamicina (50 mg/mL). Transcurrida esta primera incubación se determinó la densidad óptica del cultivo a $\lambda=600$. Este dato sirvió para ajustar la densidad óptica inicial del siguiente cultivo en Medio de Inducción (MI), que fue de 0,15, en ningún caso añadiendo un volumen de inóculo superior al 10% (V/V). Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el primer caso, incubándose por un periodo de 6 horas, tras el cual se ajustó de nuevo la densidad óptica del cultivo a 0,15 añadiendo MI.

De forma paralela se preparó una suspensión (10^6 /mL) en MI de esporas frescas de la estirpe de *F. oxysporum* que se deseaba transformar.

Se mezclaron 100 μ L de la suspensión de esporas con 100 μ L del cultivo de bacterias y se extendió la mezcla sobre una membrana de nitrocelulosa (0,45 μ m de poro) colocada en placas Petri con Medio de Cocultivo (MI con agar bacteriológico al 2% (m/V)) complementado con Kanamicina (50 mg/mL). La mezcla fúngico-bacteriana fue incubada durante 48 horas a 25°C y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las membranas fueron cortadas con un bisturí estéril en porciones de aproximadamente 1 cm². Las porciones fueron transferidas a una nueva placa con un medio selectivo, como fue el medio PDA complementado con Higromicina B (75 mg/mL), o Fleomicina (100mg/mL) para seleccionar las estirpes de *F. oxysporum* transformadas; y Cefotaxima 200 nM (40 mg/mL) para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*. Se incubaron durante 5-7 días a 25°C en este medio. Las colonias de *F. oxysporum* resultantes fueron replicadas por separado en nuevas placas del mismo medio de selección. Posteriormente se obtuvo a partir de cada una de ellas una nueva colonia procedente de un único microconidio mononucleado.

Compuesto	MM	MI
^{1*} K-Buffer	1 mL	1 mL
^{2*} M-N-Buffer	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
^{3*} Elementos traza	0,5 mL	0,5 mL
Glicerol 50% (V/V)		1 mL
^{4*} MES 1 M		4 mL
^{5*} Acetosiringona 0,2 M		0,1 mL
H ₂ O estéril	94,15 mL	89,45 mL

^{1*} Tampón K: K₂HPO₄ 200g/L, KH₂PO₄ 145g/L, ajustado a pH 7.

^{2*} Tampón M-N: MgSO₄·7H₂O 30g/L, NaCl 15g/L.

^{3*} Elementos Traza: ZnSO₄·7H₂O (100 mg/L), CuSO₄·5H₂O (100 mg/L), H₂BO₃ (100 mg/L), MnSO₄·H₂O (100 mg/L), Na₂MoO₄·2H₂O (100 mg/L).

^{4*} MES: Ácido 2-(4-morfolino) etanosulfónico.

^{5*} Acetosiringona 0,2 M: 39,24 mg de Acetosiringona en 1 mL de etanol absoluto.

Tabla 5. Compuestos y proporciones en la elaboración de medio mínimo (MM) y medio de inducción (MI).

10. Reacciones en cadena de la polimerasa

Reacción en cadena de la polimerasa convencional, PCR.

Este método, desarrollado por Saiki *et al.* (1988), permite amplificar o generar múltiples copias de un fragmento de ADN específico a partir de ADN molde.

Los ensayos se prepararon en tubos de 0,2 mL. Los reactivos que intervienen en una reacción convencional son los siguientes (para 20 µL de volumen final):

- **ADN molde:** Es el ADN que se usa como horma en la generación de las múltiples copias, generalmente ADN genómico de un único organismo, estirpe, o cepa. En el caso de ADN procedente de *F. oxysporum* o de un vegetal se añadieron 5 ng/µL. En el caso de ADN plasmídico como norma general se añadieron 0.5 ng/µL.

El primer análisis de posibles colonias bacterianas transformadas se realizó por PCR. En este caso el ADN molde se utilizó sin previa purificación. Con una punta de un palillo estéril se recogió parte de una única colonia desde una placa de crecimiento; la

punta del palillo se sumergió en 10 μL de agua Milli-Q y se añadió 1 μL de esta suspensión de bacterias a la reacción.

- **Cebadores:** Son oligonucleótidos, generalmente entre 20 y 25 pb que delimitan el fragmento de ADN a amplificar. La especificidad es crucial a la hora de su diseño, que se basó en el criterio de la temperatura de anillamiento, en la que se tiene en cuenta parámetros como la longitud del oligonucleótido y su porcentaje en composición G-C. Como norma general, los cebadores diseñados tenían una temperatura de anillamiento en torno a los 60°C. Además se cuidó que no formaran bucles en sí mismos o dímeros entre ellos. Para observar todos los parámetros de estos oligonucleótidos se utilizaron los programas VectorNTI Advance 9 (Invitrogen) y Geneious 8.0.5.

Cuando se quería disponer de fragmentos de ADN útiles en la construcción de plásmidos se añadió a los cebadores una secuencia extra en el extremo 5' que permitía el reconocimiento de enzimas de restricción.

Se añadieron al volumen de reacción para una concentración final de 0,125 μM .

Los cebadores fueron suministrados por la casa comercial IDT. La descripción de los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se encuentra detallada en las tablas 6 y 7 del apéndice II.

- **dNTPs:** Son los nucleótidos que se utilizan para la formación *de novo* del amplicón. Se añadieron a 0,2 mM en concentración final.

- **ADN polimerasa:** Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo utilizando distintas enzimas polimerasas de ADN altamente termoestables, dependiendo del objetivo de la amplificación.

- **DNA polymerase (Biotools):** Producida por el organismo termófilo *Thermus thermophilus*. Fue utilizada de forma rutinaria en ensayos de comprobación e identificación de fragmentos clonados, plásmidos y ADN genómico, así como otros ensayos en que la fidelidad de la secuencia producida no era limitante. Se añadieron 0,1 μL en cada reacción. Para su uso fue necesario añadir Standard Reaction Buffer en concentración final 1X a la reacción de PCR, que entre otros compuestos contiene Mg^+ (MgCl_2), ión cofactor de la enzima.

-
- **Enzima PCR Extender Polymerase Mix (5 Prime):** Procedente del organismo *Thermus aquaticus*. Utilizada cuando se requería una alta fidelidad en la secuencia, o en amplificaciones mayores de 3 kb. Se añadieron 0,1 µL de enzima en cada reacción. Los diferentes tampones de reacción que incluye el kit se añadieron a concentración final 1X según los requerimientos.

El termociclador utilizado para llevar a cabo las reacciones de amplificación fue el modelo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. En el perfil del programa de PCR se incluyó un proceso de desnaturalización del ADN inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación consistentes en una fase de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, una segunda fase de anillamiento de los cebadores entre 56°C y 63°C, dependiendo la temperatura óptima de la pareja de cebadores, durante 30 segundos, y una tercera fase de elongación de 72°C durante 1-3 minutos, dependiendo del tamaño de fragmento que se quiso amplificar. Como pauta general se programó 1 minuto por cada 1.000 pares de nucleótidos. Todos los programas de PCR utilizados incluyeron una fase de elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Transcripción inversa. Síntesis de ADNc.

La reacción de transcripción inversa utiliza ARN como molde para generar copias de ADN copia (ADNc). Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el kit PrimeScript™ RT reagent (Takara Biosystems) siguiendo las condiciones que detalla el fabricante. Por cada 10 µL de reacción de síntesis de ADNc se añadieron 500 ng de RNA total previamente tratado para eliminar el ADN genómico, 2 µL de tampón de reacción 5X que contiene dNTPs, 0,5 µL de cebadores poli-dT 50 µM, 0,5 µL de enzima Prime Script RT, y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. La reacción se llevó a cabo en un termociclador. Las condiciones fueron: una etapa a 37°C durante 15 minutos para la síntesis de ADNc, seguida de otra etapa a 85°C durante 5 segundos para la inactivación de la enzima. Cuando el producto de reacción no fue utilizado tras sus síntesis se conservó a -80°C.

Para comprobar la integridad del ADNc y su posible contaminación con ADN, se realizaron amplificaciones mediante PCR convencional de regiones del gen codificador del factor de elongación EF1 α (Iida *et al.*, 2006) que incluyen un intrón, lo cual permite observar la consiguiente diferencia de tamaños entre los amplicones genómicos y ADNc.

PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa permite la visualización a tiempo real de la cinética de la reacción, y no sólo el producto final, como ocurre en la PCR estándar. A partir de los estudios basados en la relación cuantitativa que existe entre la cantidad de secuencia molde al comienzo de la reacción y la cantidad de producto obtenido (Higuchi *et al.*, 1992), se diseñaron sistemas que permitieron detectar el producto amplificado a medida que se va formando en los sucesivos ciclos de amplificación. La PCR a tiempo real utiliza la fluorescencia emitida por las moléculas que se unen a la doble cadena de ADN durante la reacción como un indicador de la cantidad de amplicón producido en cada ciclo de amplificación.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ L que contenía 1X KAPA SYBR Green qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 500 nM de cada cebador y 1 μ L de la reacción de transcripción inversa. Se utilizó el fluorocromo SYBR Green, de unión al surco menor de la molécula de ADN, debido a su fácil uso, su bajo coste y su capacidad de funcionar adecuadamente en una gran variedad de muestras y rangos de expresión variables. Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador StepOnePlusTM Real-Time PCR system (Applied Biosystems) usando el perfil recomendado: 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. La presencia de un producto de amplificación único y específico se comprobó mediante el estudio de la curva de disociación, cuyo perfil térmico fue el incremento de 0,3°C cada 5 segundos en un rango de 55 a 95 °C. Además los productos finales de PCR cuantitativa se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

En todos los casos la región amplificada, definida por los cebadores, fue de alrededor de 100 pb, como se indica en las instrucciones del fabricante del termociclador. Antes de usar cada pareja de cebadores, se desarrolló un análisis de su eficiencia de amplificación en el termociclador, calculándola mediante la construcción de una recta patrón formada por los datos Ct de seis diluciones seriadas de ADNc molde. Todas las parejas de cebadores descritas en la tabla 7 tuvieron una eficiencia entre 96,8 y 102,1%.

El análisis de datos se realizó mediante el método de comparación de Ct (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001), o método de cuantificación relativa de nivel de expresión del gen a analizar respecto de un gen control endógeno de expresión constitutiva, que en el caso de *F. oxysporum* fue el gen *EF1α* (Iida *et al.*, 2006), y en el caso de *P. vulgaris*, el gen de la Actina.

El ciclo umbral Ct (*threshold cycle*) en cada reacción se define como el primer ciclo de amplificación donde la señal de fluorescencia es mayor que el límite de detección mínimo establecido por un umbral asociado con el inicio de un crecimiento exponencial de la curva de amplificación del producto de PCR. Así, una muestra con mayor contenido de ADN que otra alcanzará antes la fase exponencial y tendrá un ciclo umbral Ct más bajo.

Para conocer la cantidad relativa de transcrito, RQ (*Relative Quantity of transcript*), el método de comparación de Ct usa la siguiente fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

El cálculo del valor $\Delta\Delta Ct$ implica restar a cada ΔCt el valor del ΔCt de una condición calibradora, que es la muestra utilizada como referencia para obtener un valor relativo de las demás muestras. Como ejemplo clarificador, se utilizaron, como calibradoras en el estudio de la expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa de la planta, muestras de *P. vulgaris* sin infectar.

En todos los análisis de PCR cuantitativa descritos en este trabajo se realizaron al menos tres réplicas biológicas, dos réplicas técnicas de la síntesis de ADNc, y reacciones en triplicado para el análisis en el termociclador. En total un mínimo de 18 reacciones por muestra.

Todos los cálculos de Ct, eficiencias de amplificación y análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa informático complementario al termociclador: StepOne™ Software V2.3 y el programa Statistix 8.0.

Cuantificación relativa de biomasa fúngica.

La cuantificación de biomasa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante la infección de *P. vulgaris* se llevó a cabo estimando la cantidad relativa de ADN por medio de PCR cuantitativa. Se recogieron muestras de tres regiones diferenciadas de las plantas infectadas a diferentes tiempos: sistema radicular, cuello de raíz e hipocotilo. Para la detección y cuantificación de ADN fúngico se utilizaron las parejas de cebadores de los genes *EF1 α* y *FTF2* descritos en la tabla 7. Ambos genes son de copia única en *F. oxysporum*. El gen de la *Actina* amplificado desde el ADN genómico de *P. vulgaris*, mediante los cebadores que también se indican en la tabla 7, fue utilizado como gen de referencia. El número de muestras, los componentes de la reacción y las condiciones de perfil térmico son las descritas en el apartado anterior, excepto que, en lugar de ADNc, se utilizó 1 ng del ADN extraído de plantas infectadas como molde para la reacción.

11. Hibridaciones tipo *Southern blot*

Para desarrollar este tipo de hibridaciones se siguieron las recomendaciones de la casa comercial Roche, recogidas en el manual de usuario “Dig User’s manual” (dNTPs marcados con digoxigenina), así como las recomendaciones generales ofrecidas por Sambrook *et al.* (1989).

Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron por un método no radioactivo que se basa en la incorporación de dUTP unido a la digoxigenina (DIG, Roche) en los fragmentos de ADN que van a ser utilizados como sondas. La digoxigenina es un esteroide encontrado en las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*, el cual, debido a sus propiedades bioquímicas, tiene facilidad para unirse a anticuerpos.

En primer lugar, se optimizaron las condiciones de la reacción de marcaje mediante PCR para obtener en cada caso una banda única y clara, indicativa de un único y específico fragmento de ADN amplificado del tamaño esperado. Después se realizó el marcaje sustituyendo en la reacción de PCR los dNTPS por la Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix (Roche). En paralelo se llevó a cabo una reacción de PCR con la mezcla de dNTPs no marcados como control positivo. Se comprobó en gel de agarosa el correcto marcaje de la sonda, ya que la banda correspondiente muestra un tamaño ligeramente superior al del fragmento sin marcar, debido al peso añadido de la digoxigenina.

Southern Blot

Las muestras de ADN digeridas con distintas enzimas de restricción fueron cargadas en geles de agarosa al 1% (m/V) y sometidas a electroforesis para una correcta separación de los fragmentos digeridos. Los geles se visualizaron con bromuro de etidio y se marcaron convenientemente para identificarlos y orientarlos.

La preparación para la transferencia del ADN del gel a una membrana de nailon consta de cuatro fases consecutivas: depurinación, desnaturalización, neutralización y equilibrado. La depurinación se realizó para favorecer la transferencia de los fragmentos de ADN mayores de 10 Kb y consistió en dejar el gel expuesto durante 5 minutos a la luz ultravioleta. Posteriormente, el gel se sumergió en la solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) durante 60 minutos. A continuación se sumergió el gel en la solución de neutralización (NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0.5 M a pH 7,5) durante otros 60 minutos. El equilibrado se realizó en la solución SSC 10X (NaCl 1,5 M y Citrato sódico 0,15 M a pH 7) durante 15 minutos.

La unidad de transferencia consistió en una bandeja de vidrio que contenía el tampón de transferencia SSC 10X, sobre el que se dispuso una placa lisa de plástico resistente a modo de puente, donde reposaban tres láminas superpuestas de papel Whatman 3MM cuyos extremos se sumergieron en el tampón. El gel se colocó en posición invertida sobre las láminas de papel Whatman 3MM, se eliminaron posibles burbujas y sobre él se dispuso una membrana de nailon, Nylon Hybond-N (GE Healthcare Life Sciences), de igual tamaño y debidamente marcada. Se dispusieron encima del mismo tres piezas de papel Whatman 3MM. Mediante una película de plástico se forraron las partes no cubiertas por el gel, asegurando de este modo que todo el tampón de transferencia atravesara el gel y la membrana. Sobre la membrana se colocó papel absorbente (10 cm de espesor) y sobre el conjunto se dispuso un peso de 1 kg aproximadamente. El ADN del gel se dejó transferir a la membrana de nailon por un mínimo de 16 horas, después de las cuales se retiró la membrana que se colocó sobre papel secante.

El ADN se fijó irreversiblemente a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta (Stratalinker®). La membrana se almacenó a temperatura ambiente entre dos papeles secantes y en oscuridad hasta su hibridación con la sonda. La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo el gel en bromuro de etidio y observando que el ADN digerido de cada carril había sido transferido.

La prehibridación y posterior hibridación de las membranas con la sonda marcada se llevaron a cabo en tubos de vidrio herméticos, con agitación circular moderada y constante, utilizando un volumen de 50 mL, suficiente para mantener las membranas siempre húmedas. La temperatura de prehibridación y de hibridación fue de 65°C para hibridaciones restrictivas (hibridación 100% homóloga), mientras que para las hibridaciones no restrictivas la temperatura fue inferior, adaptada a cada caso.

En primer lugar se realizó la prehibridación, que consistió en incubar la membrana con el tampón de hibridación (SSC 5X, N-laurilsarcosina 0,1% (m/V), SDS 0,02% (m/V) y reactivo bloqueante (Roche) 1% (m/V)) durante al menos una hora. Seguidamente se añadió la sonda previamente desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C), incubándose la membrana en este tampón de hibridación al menos durante 16 horas.

Tras el periodo de hibridación de la sonda se procedió al lavado de la membrana. Primeramente se retiró el tampón de la sonda, que se guardó a -20°C para su posterior uso en una nueva hibridación. El lavado consistió en incubaciones seriadas con agitación en distintas soluciones: dos lavados de 5 minutos en SSC 2X y SDS 0,1% (m/V), y dos lavados a temperatura de hibridación en SSC 0,1X y SDS 0,1% (m/V).

La detección de la sonda se llevó a cabo empleando soluciones diluidas en tampón maleico que constaba de ácido maleico 100 mM y NaCl 150 mM ajustado a pH 7.5 con NaOH.

Las membranas se equilibraron en tampón de lavado (tampón maleico con pilosorbato 20 0,3% (V/V), comercialmente conocido como *Tween 20* (Bio-Rad)) durante 5 minutos. Posteriormente se bloquearon en tampón bloqueante (tampón maleico con reactivo bloqueante 1% (m/V)) durante al menos 30 minutos. Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron en tampón bloqueante al que se añadió el anticuerpo antidigoxigenina (Roche) en proporción 1:20.000 durante al menos 30 minutos. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces en tampón de lavado durante 15 minutos y se equilibraron en tampón de detección (Tris-HCl 100 mM, NaCl 10 mM a pH 9,5) durante 5 minutos. Tras el equilibrado, la membrana se colocó sobre una lámina de papel de plástico y sobre ella se extendió 1 mL del sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) diluido 1:100 en tampón de detección por cada 100 cm^2 de membrana. Posteriormente, se incubó la misma durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se procedió a detectar la quimioluminiscencia en el equipo de detección Intelligent Dark Box II (Fujifilm).

Para retirar completamente la sonda de la membrana se realizaron dos lavados con una solución hervida de SSC 0,1X y SDS 0,1X tras la detección, y un lavado de similares características cada día, manteniéndose en agitación la membrana en la solución. Al tercer día de lavado la membrana se secó y se dispuso sobre papel secante para una nueva hibridación.

12. Programas informáticos y bases de datos

Genious 8.0.5 (Biomatters)

Este programa fue utilizado como una base de datos personal de múltiples secuencias utilizadas en este trabajo. Fue utilizado en el alineamiento de secuencias, bien mediante su propio programa o mediante otros programas de alineamiento que están incorporados en esta versión, tales como MUSCLE o CLUSTALW. Además, se utilizó como herramienta en la edición gráfica de los plásmidos.

Vector NTI Avanced 9 (Invitrogen)

Utilizado principalmente para la edición de plásmidos y diseño de oligonucleótidos y sondas.

StepOne™ Software 2.3 (Life technologies)

Se utilizó para llevar a cabo los cálculos, el análisis y la estadística de los datos tomados mediante PCR a tiempo real.

NanoDrop ND-1000 3.3 (NanoDrop technologies)

Se utilizó para el análisis de los datos espectrofotométricos obtenidos para la cuantificación de ácidos nucleicos.

LAS-1000 plus 1.31 (Fujifilm)

Utilizado para la visualización de imágenes de quimioluminiscencia durante los ensayos de hibridación.

Alphaview Software 3.3 (Protein Simple)

Utilizado en la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa mediante irradiación de luz ultravioleta.

LAS – Advanced Fluorescence Lite 1.8.2 (Leica Microsystems)

Se utilizó para el montaje de las imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal.

ImageJ 1.48

Utilizado para la cuantificación relativa de biomasa fúngica dentro de los haces vasculares mediante el análisis de imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal.

Statistix 8.0

Utilizado para análisis estadísticos.

Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation)

Utilizado como procesador de textos, así como editor de figuras y tablas.

Zotero Standalone 4.0

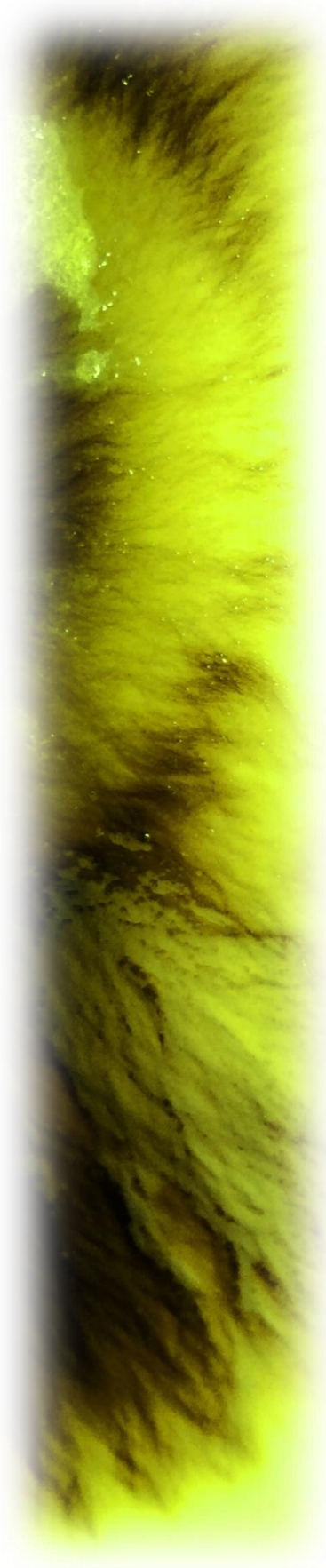
Se utilizó para la edición bibliográfica.

Bases de datos de genomas

Las bases de datos consultadas fueron:

- **Broad Institute** (<https://www.broadinstitute.org>).
- **Joint Genome Institute** (<http://jgi.doe.gov>).
- **National Center for Biotechnology Information**

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



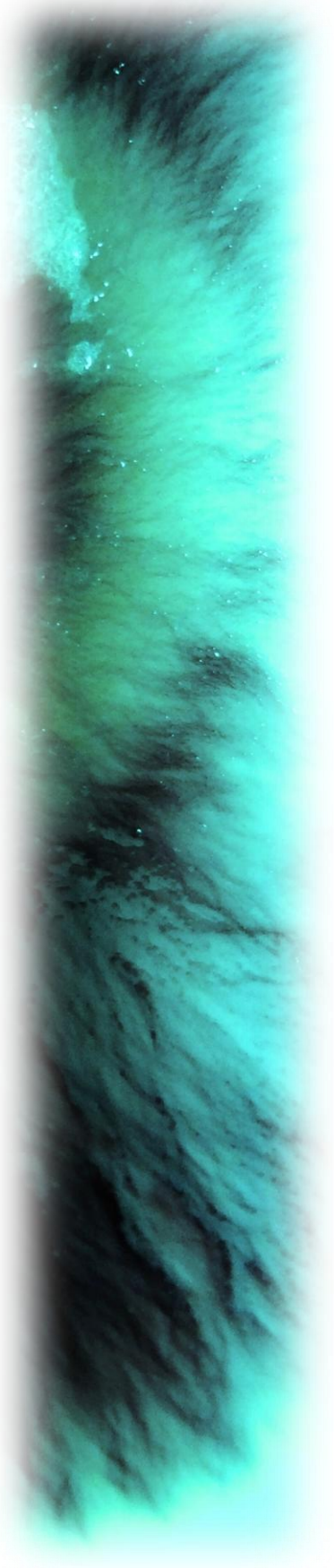
-Apéndice II-

Construcción	Cebador	Número de acceso	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
pRF-HU-PFTF1GFP	B310User	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCAGCCATTCATGGATGACATAAC GAATTC	670
	5FTF1RBamHI		GGATCCGGCTCTGCCAGAGACAAAGTTAC	
	5GFpFBamHI	gGFP ^c	GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	782
	GFPUserR		GGACTTAAUCCAGATTCGTCAAGCTGTTTG	
pFTF1	B310User	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCAGCCATTCATGGATGACATAAC GAATTC	4890
	M40AUser		GGACTTAAUUCTGGGTATGGATGAGTTGGCGAC	
pPgpdA::FTF1	FTF1UserF	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUCTAATGACCCTGTTGCTGTA	3290
	FTF1UserR		GGACTTAAUGATGTCCGGCCATGCCG	
pFTF2	PhleoF-Apal	pJL43-RNAi ^c	GGGCCCCCTCGAGGTCGACTCTAG	1492
	PhleoR-Scal		AGTACTGATATCAAGCTTGCAAATTAAGCCTTC	
	PromFTF2User-F	FOXG_09390 ^b	GGACTTAAUUCTGTCTCTCTCGCAGGGCAGG	4717
	TerFTF2User-R		GGGTTTAAUAGCGGAGGAATAGAAGGGTGTGG	
pPhleo-RNAi	RNAi-U1	pJL43-RNAi ^c	GGGTTTAAUCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG	3406
	RNAi-U4		GGTCTTAAUGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT	
pFTFPhleo-RNAi	SilFTF2F-NcoI	FOXG_09390 ^b	CCATGGGGACGGATCATCACCTACCTGAGCC	462
	SilFTF2R-NcoI		CCATGGCGTGTGGCTTCATGTTGGGATT	
pFTFHyg-RNAi	RNAi-User1	DQ280313 ^a	GGGTTTAAUUTTGGGACGCTCGAAGGCTTAA	2308
	RNAi-User2		GGACTTAAUGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT	
Otros cebadores utilizados				
	B285	DQ280313 ^a	ATCGTCACTACGCCCGTCCG	300
	A5		TGGGTGTGATCTAGTAGGGAAACG	
	M18B	DQ280313 ^a	CGCCAAAACGCAAGCTCAACTTC	689
	M19A		GCGAGGGGTGCCGAAACAAAGC	
	Hph-F	pRF-HU ^c	GCGCTTCTGCGGGCGATTTG	549
	Hph-R		CGGGTTCGGCCATTCGGAC	
	PhleoF	pJL43-RNAi ^c	CCAAGTTGACCAGTGCCGTTCC	291
	PhleoR		CGCCGATCTCGGTCATGGC	

Tabla 6. Listado de cebadores utilizados en la construcción de plásmidos y de uso común. (a) Número de acceso en *Gen Bank*, (b) locus en el genoma de la estirpe 4287 de *F. oxysporum*, (c) plásmido.

Cebador	Número de acceso	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>F. oxysporum</i>			
EBR1-F EBR1-R	FOXG_05408 ^b	ACCACCGACAGCAACAGCAGC GTTGGGTCTGGCGTTGATCCTC	155
EF1alpha-F EF1alpha-R	FOXG_03515 ^b	CATCGGCCACGTCGACTCT AGAACCCAGGCGTACTTGAA	144
FNR1-F FNR1-R	DQ387858 ^a	CCAGCAGTTCATGTATGGTGGCG CACCTGAGAGGGGTCTGATATGCC	136
FOW2-F FOW2-R	AB266616 ^a	CAAATCCTTCGCCCTCACATCTG GATCCTGGTGTCAAAGCCGAGG	130
FTF1-F FTF1-R	DQ280313 ^a	TGTGGTGGCCAGGATATGATG TGCATGCCTGCCTTGACAT	110
FTF2-F FTF2-R	FOXG_09390 ^b	ATGCTCACACCCACATTCT ATCCCCAAAGACAAGCTGAC	108
GS-F GS-R	FOXG_05182 ^b	TGCCAAGGGCTATGGCTACT CACGGTAAGGGTCAGCGTTAG	97
PACC-F PACC-R	AY125958 ^a	CATGGCAACCTCTCCGTTCCC GGGCAGGTAGTATTGCTGAGCCG	132
RHR1-F RHR1-R	FOXG_05541 ^b	CCATGCTGAGATTCTCCACGGC CATGACAGGATCGGTTTGGGGTG	175
RHR2-F RHR2-R	FOXG_09999 ^b	CAAGTGGATGGGAGACCTACGCC TGAGCCTGCATTGGCGATTGG	158
SGE1-F SGE1-R	FOXG_10510 ^b	CAGCCGTATCCTTGCCAATA TGGTTGACTTGCCGTTCTT	101
SIX1-F SIX1-R	AJ608702 ^a	GAGCCGCCTCAATCGCCTG GGCCAAGTTGCGCGATATGTG	194
SIX6-F SIX6-R	ACY39286.1 ^a	GCTTTTTCGTGGCGAACCC TTTTCCCGTTGCTGAGATTGCG	102
SIX8-F SIX8-R	FJ755837.1 ^a	CCTAGCTGTCTCTGTGGCTGCTACG CGTTCGACAAGGGCTCTCTCGTC	114
SIX11-F SIX11-R	KC701449.1 ^a	CACAGGGCTTGCGAAGCTG GCCTCGATACCAGCGTTACCGC	131
<i>P. vulgaris</i>			
Actin-F Actin-R	Phvul.011G064500 ^c	GAAGTTCTCTCCAACCATCC TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	175
ERF1-F ERF1-R	Phvul.007G127800 ^c	CCTGTTGTGGCTCTGAAGAGGAAAC CAGGACCAAGGTCTTCAAACACGAC	124
ERF2-F ERF2-R	XM_003549886 ^d	GGGAAAGTTTCGCGCGGAG CGGAGTTAACCTCAACGGAAAATTC	164
PR1-F PR1-R	Phvul.003G109100 ^c	CAGGCACTACACTCAGGTTGTTTGGGA TTGCCAGGAGGAGCATAGTTGCAA	111
PR5-F PR5-R	Phvul.001G016700 ^c	CGGAAAATGTGTCACCGGAGACTG ATTGTAACCGTCCACCAGGCTCAC	148

Tabla 7. Listado de cebadores utilizados en PCR a tiempo real. (a) Número de acceso en *Gen Bank*, (b) locus en el genoma de la estirpe 4287 de *F. oxysporum*, (c) locus en el genoma de *P. vulgaris*. (d) locus en el genoma de *Glicine max*.



-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 ONLINE* **19**, 1665–1681.
- Agrios, G.N.** (1997) Plant pathology, Academic Press.
- Agrios, G.N.** (2005) Plant pathology, 5th eds., Academic Press.
- 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.** (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.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. and Kazan, K.** (2004) Antagonistic Interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE* **16**, 3460–3479.
- 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.** (2008) *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* **13**, 145–150.
- 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., Molina, A. and Solano, R.** (2002) Constitutive expression of Ethylene response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**, 23–32.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.** (1983a) An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 15–IN13.

-
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.** (1983b) 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.** (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.
- Burnett, J.H.** (1984) Aspects of *Fusarium* genetics. The applied mycology of *Fusarium*. In pp. 39–69. Held at Queen Mary Collage of London.
- 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.
- Canero, D.C. and Roncero, M.I.G.** (2008) Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* **154**, 1474–1481.
- 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.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira, F.I. and Di Pietro, A.** (2003) The pH signaling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **48**, 765–779.
- Catinot, J., Huang, J.-B., Huang, P.-Y., et al.** (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: ERF96 in *Arabidopsis* defence. *Plant Cell Environ.* **38**, 2721–2734.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W. and Lin, T.-P.** (2013) The *Arabidopsis* Ethylene response factor1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *PLANT Physiol.* **162**, 1566–1582.
- 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.

- Correl, 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.
- 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.
- Daboussi, M.J. and Langin, T.** (1994) Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Genetica* **93**, 49–59.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W., Straeten, D.V.D., Manners, J., Dennis, E.S. and Dolferus, R.** (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*: ATAF2 represses PR-genes transcription. *Plant J.* **43**, 745–757.
- Desjardins, A.E.** (2003) *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 177–198.
- 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.
- 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.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Meglecz, E. and Roncero, M.I.G.** (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.
- 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.
- Di, X., Takken, F.L. and Tintor, N.** (2016) How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* **7**, 170.

-
- Doczi, I., Gyetvai, T., Kredics, L. and Nagy, E.** (2004) Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 773–776.
- Does, H.C. van der, Duyvesteijn, R.G.E., Goltstein, P.M., Schie, C.C.N. van, Manders, E.M.M., Cornelissen, B.J.C. and Rep, M.** (2008b) Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1257–1264.
- Does, H.C. van der, Lievens, B., Claes, L., Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C. and Rep, M.** (2008a) The presence of a virulence *locus* discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates: a virulence *locus* defines f. sp. *lycopersici*. *Environ. Microbiol.* **10**, 1475–1485.
- Does, H.C. van der, Yang, A., Hughes, T. and Rep, M.** (2014) The binding site of a transcription factor encoded on both core and accessory genomes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is enriched in the promoters of effector genes.
- Dotor Robayo, M.Y. and Cabezas Gutiérrez, M.** (2014) Mechanisms of systemic resistance in plants. *Acta Iguazu* **3**, 1–19.
- Dufresne, M., Lee, T. van der, M'Barek, S.B., et al.** (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: F-box protein required for pathogenicity. *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.
- Feschotte, C. and Pritham, E.J.** (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 331.
- Finnegan, D.J.** (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* **5**, 103–107.
- 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.
- García-Sánchez, M.A., Martín-Rodríguez, N., Ramos, B., Vega-Bartol, J.J. de, 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.** (2014) 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., Mar Jiménez-Gasco, M. del, 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*. In Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi., pp. 473–479. Springer.
- Glass, N.L., Jacobson, D.J. and Shiu, P.K.** (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 165–186.
- Glass, N.L., Metzner, R.L. and Raju, N.B.** (1990) Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only a mating type sequence. *Exp. Mycol.* **14**, 274–289.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205–227.
- Godoy, P., Cano, J., Gene, J., Guarro, J., Hofling-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.
- 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., 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.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R.** (1995) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning 3: a practical approach., pp. 1–36. IRL Press Ltd.
- 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.
- 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., 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., Ooijen, G. van, Vroomen, M.J. de, 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.
- 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.
- Huang, P.-Y., Catinot, J. and Zimmerli, L.** (2015) Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *J. Exp. Bot.*, erv518.
- Iida, Y., Ohara, T. and Tsuge, T.** (2006) Identification of genes up-regulated during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 179–189.
- 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., 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., 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., 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.

- Jiménez, T., Martín, I., Labrador, E. and Dopico, B.** (2007) A chickpea Kunitz trypsin inhibitor is located in cell wall of elongating seedling organs and vascular tissue. *Planta* **226**, 45–55.
- 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.
- 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., et al.** (2014) *EBR1* genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species: *EBR1* in virulence of *Fusarium* species. *Environ. Microbiol.* **16**, 1982–2003.
- 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.
- Kendrick, J.B. and Snyder, W.C.** (1942) Fusarium yellows of Beans. *Phytopathology* **32**, 1010–1014.
- Kerenyi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Olah, 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.** (2007) Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**, 373–391.
- Kistler, H.C., Benny, U., Boehm, E.W.A. and Katan, T.** (1995) Genetic duplication in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **28**, 173–176.
- Kraft, J.M. and Haglund, W.A.** (1978) A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* **68**, 273–276.
- Lagopodi, A.L., Ram, A.F., Lamers, G.E., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A., Lugtenberg, B.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.

-
- Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A.** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nat Biotech* **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. and Summerell, B.A.** (2006) The *Fusarium* laboratory manual, Blackwell publishing.
- 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.
- Lievens, B., Houterman, P.M. and Rep, M.** (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 201–215.
- Lin, W.-C., Lu, C.-F., Wu, J.-W., et al.** (2004) Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res.* **13**, 567–581.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. and Solano, R.** (2003) Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *PLANT CELL ONLINE* **15**, 165–178.
- 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.
- 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., 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., Does, H.C. van der, Borkovich, K.A., et al.** (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**, 367–373.
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B.A. and Sharon, A.** (1998) Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* **102**, 491–496.

- 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., Gonzalez-Reyes, J.A. and Ruiz-Roldan, C.** (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* **7**, 112–121.
- 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., Shenk, 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.
- 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., Cornelissen, B.J. and Rep, M.** (2009a) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol* **10**, 1–18.
- Michielse, C.B., Wijk, R. van, Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C. and Rep, M.** (2009b) The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog.* **5**, e1000637.
- 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.
- 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**, 4321–4326.

-
- 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., Dignani, M.C. and Anaissie, E.J.** (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 479–504.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O.** (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification, Pennsylvania State University Press.
- Nürnberger, 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.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., 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.
- Ohara, T., Inoue, I., Namiki, F., Kunoh, H. and Tsuge, T.** (2004) REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* **166**, 113–124.
- 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.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Mayayo, E. and Di Pietro, A.** (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.
- 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**, 1.

- 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**, 990–993.
- 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.
- Pfaffl, M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002–2007.
- Pieterse, C.M.J., León-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. van der, Zamioudis, C., León-Reyes, A. and Van Wees, S.C.M.** (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.
- 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., Boer, A.D. de, 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., 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.
- Rep, M. and Kistler, H.C.** (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 420–426.
- Rep, M., Does, H.C. van der, 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.

-
- Ribeiro, R. and Hagedorn, D.J.** (1979) Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* **69**, 859–861.
- Roncero, M.I., Di Pietro, A., Ruiz-Roldán, M.C., et al.** (2000) Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**, S47–53.
- Sain, M. de and Rep, M.** (2015) The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 23970–23993.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H.** (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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.
- 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.
- Schmidt, S.M., Houterman, P.M., Schreiver, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., Boeren, S., Takken, F.L. and Rep, M.** (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* **14**, 119.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., et al.** (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet.* **46**, 707–713.
- Seifert, K.A. and Levesque, C.A.** (2004) Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. In *molecular diversity and PCR-detection of toxigenic Fusarium species and ochratoxigenic fungi.*, pp. 449–471. Springer.
- Selma-Lázaro, C. and González-Candelas, L.** (2014) Development of a recyclable marker selection system for *Penicillium digitatum*.
- 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.

- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. and Ecker, J.R.** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive3 and ethylene-response-factor1. *Genes Dev.* **12**, 3703–3714.
- Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., et al.** (2011) A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal dead blight fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog* **7**, e1002310.
- Sukno, S.A., Garcia, V.M., Shaw, B.D. and Thon, M.R.** (2008) Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 823–832.
- Summerell, B.A., Salleh, B. and Leslie, J.F.** (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* **87**, 117–128.
- Tamayo-Ramos, J.A., Flipphi, M., Pardo, E., Manzanares, P. and Orejas, M.** (2012) L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microb. Cell Factories* **11**, 1.
- Teunissen, H., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J.C. and Haring, M.A.** (2002) Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Genet. Genomics MGG* **268**, 298–310.
- 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.
- Torres-Zabala, M. de, Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Egea, P.R., Bögre, L. and Grant, M.** (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* **26**, 1434–1443.
- 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*.
- Ullán, R.V., Godio, R.P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R., Kosalkova, K. and Martín, J.F.** (2008) RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using β -lactam genes expression. *J. Microbiol. Methods* **75**, 209–218.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., et al.** (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 645–656.
- Vega-Bartol, J.J. de, Martín-Domínguez, 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.

-
- 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., Shahi, S. and Rep, M.** (2015) Fluorescence assisted selection of transformants (FAST): using flow cytometry to select fungal transformants. *Fungal Genet. Biol.* **76**, 104–109.
- 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.* **84**, 2097–2100.
- 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.
- 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.
- Zhao, C., Waalwijk, C., Wit, P.J. de, Lee, T. van der 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.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., et al.** (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12539–12544.



-Agradecimientos-

A mi tutor de tesis, el Dr. José María Díaz Mínguez por darme la oportunidad de cumplir un sueño. Por aceptarme en su grupo de investigación y darme su confianza. Por no establecer un redil con el que limitar mis errores y mi aprendizaje. Por su paciencia, su ayuda y su buen hacer en todo lo que he necesitado durante estos años. Gracias Chema.

A mis compañeras Vega y Virginia, con quienes comparto este trabajo. A Vega por cogerme de la mano la primera vez que pisé un laboratorio. Por enseñarme cómo se trabaja, por su ayuda, sus consejos y por tener una paciencia extrema conmigo. A Virginia por ser compañera, amiga y cómplice en buenos y en malos momentos, por ser una trabajadora sin igual y regalarme incondicionalmente todo lo que he necesitado durante estos años.

Sin mi tutor y sin mis compañeras este trabajo no habría sido posible.

Tampoco habría sido posible sin la ayuda económica concedida por el programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del MECD, ni sin la concesión del proyecto de investigación por parte del MINECO, que es de justicia agradecer.

A mis coodirectores Dr. Ernesto Pérez Benito por su ayuda, su trato, su cercanía y buena gestión del grupo. A la Dr. Serenella A. Sukno por sus consejos, sus ganas, y por intentar sacar lo mejor de mí. Al Dr. Michael Thon por su amabilidad y disponibilidad frente a cualquier necesidad relacionada con la bioinformática. Al Dr. Dov Pruski por ser un compañero de poyata más, por su sabiduría, sus consejos, y por hacernos disfrutar como capitán del CIALE Fútbol Club.

Ha sido un orgullo para mí aprender cada día de estos investigadores, así como poder hacerlo en el grupo de investigación del Dr. H. Corby Kistler en la Universidad de Minnesota. Allí estuve muy cómodo, y los cuatro meses parecieron cuatro días. Quiero agradecer en especial a Corby y a Karen por todo lo que me ilustraron, por la barbaridad de cosas que aprendí y experimenté. Compré billetes de avión de ida y vuelta para personas diferentes, tanto científica como personalmente.

A mis maestros. A cada uno de los profesores del máster de Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca, por forjar en mí no sólo la materia que aparece en los libros, sino una consciencia crítica, capacidad de presentación y debate. Por su disponibilidad ante cualquier duda o necesidad. Quisiera de manera especial acordarme y agradecer a Paco, profesor de la vida, y de vez en vez de matemáticas, de la generación del 86 en el I.E.S. Parquesol, y a Doña Magdalena y a Don Pablo quienes iniciaron mi pasión por la naturaleza en el Colegio I. Martín Baró.

A mis compañeros de laboratorio. Muchas han sido las personas que han pasado por las poyatas del CIALE durante estos años, especialmente en el Laboratorio 1, a los que agradezco sin duda su ayuda y amistad. A mis admirados predecesores, los Doctores Fernando, Brisa y José Javier cuyo trabajo he continuado con la esperanza de estar a la altura. A Raúl, compañero de mesa, de tertulia y debate, el informático, al que pregunté sin comprobar en el

Maniatis y al que deseo lo mejor con su Hugo. A Eduardo por duplicar el material de laboratorio del que disponíamos, trabajador incansable, un espíritu al que admirar. Lo mejor para tu familia. A Walter, por las bofetadas que me daba cuando pensaba que hacía las cosas bien y después me fijaba en él; de él aprendí a hacer cosas nuevas, cosas bien hechas, a ser autosuficiente en un laboratorio y a decir boludeces argentinas. A Vinicio y a Daniela, por hacerme partícipe de sus vidas salmantinas, a Dany por ser una genial compañera excepto el día en que sonó las Spice Girls en el laboratorio y a Vini porque muy, pero muy de vez en cuando, me daba alguna que otra asistencia los miércoles. Gracias chicos. A Thais, Rebeca, Carlos, Vicky, Fran y Elena con quienes me hubiera gustado compartir más horas de laboratorio. Al gran Álex, la alegría del laboratorio, y la carcajada sin aliento fuera de él. A Ely, que me ayudó lo que no está escrito con un post-it de reserva pegado en su hombro. A mi amigo Wilson, todo un crack, bondad, voluntad, y en ocasiones gula; personas como él hacen del laboratorio un sitio donde estar a gusto. A Monia, Víctor, Antonio y Leyre de los que aprendí a aprender, un gusto compartir con ellos la poyata y los buenos ratos. A Irene por su trabajo con las construcciones y ser mi vecina más rockera dentro y fuera del labo. A Ángel por los buenos ratos. A Tomás por su paciencia en el cuidado de los ensayos de infección. A Isa por su ayuda con los *Western Blot*. A Nacho por su ayuda con la inclusión en parafina y uso del microtomo. A Itu por hacer de ir a electroporar un placer. A mi amigo Gaby, que llego tarde y casado a España. Una pena. Por todos esos momentos, por quererme tanto, ¡que lo sé yo!, por dejarme la puerta de su casa abierta, y por tener una mujer espectacular a la que tanto admiro.

A ciertas estirpes de *F. oxysporum*.

A mis compañeros del máster, ¡de cada uno de ellos aprendí todo lo que me dio tiempo!. A Leví y a Nistal, mis amigos de la carrera por su apoyo y los buenos ratos que van quedando lejos pero grabados. A Marta por sus películas de terror, a Esther y Marcos por su amistad y a Lucía por sus consejos, ayuda y ser una amiga incondicional.

A la familia de Aída y a Jakob por hacer de mi estancia en EE.UU. unas fechas inolvidables. A Elena por esas carreritas que nos venían tan bien para desestresar. Ni mucho menos quisiera olvidarme del mejor equipo de fútbol del mundo, que hacía lo posible por sudar en enero para tomar una caña bien fría. El CIALE F.C.

A mis amigos. A la peñita, por ser un gusto reunirnos de vez en cuando una docena de amigos que me apoyan incondicionalmente, especialmente La Miguela, del que aprendo de qué va esto de la vida. Gracias chicos. A los Saboteurs, en especial a Estela, Berta y Cris por su cariño a un pucelano, ¡cosa impensable!

A Elena Bécares porque la llevo siempre dentro. Al Geme por su amistad. A Laura por querer todo lo mejor para mí, por todas las sensaciones que hemos vivido, a Xp por estar atento cada semana desde hace 12 años, al Dr. H por sus consejos y su crítica admirable de romper con lo establecido, a Male por su magia y complicidad. A Romo, porque desde que éramos críos nos hicimos el uno al otro personas apasionadas con cada cosa que hacíamos. A

Isol por tratarme tan bien. A Víctor por animarme a estudiar biología, aunque tuviera que irme a Salamanca. A Amanda por ser como es, por haberme hecho mejor de lo que era. A McLovin agradecerle únicamente los dibujos de la figura 2, y desagradecerle su participación en retrasar esta tesis considerablemente cada fin de semana: que si su sexytud, que si sus bailes de Michael Jackson...

Gracias amigos.

A mi familia. A mis abuelos, a quienes echo mucho de menos, y deseo que se sintieran orgullosos de esta tesis. A la familia Niño y a la familia Sánchez por ser mis cimientos. A mis tíos y tías que siempre preguntan qué tal va la vida por Salamanca. A mi prima Carolina, con quien me he criado y tengo la certeza que siempre nos cuidaremos mutuamente. A mi prima Rebeca por el arte que desprenden sus manos y que luzco con orgullo en la portada de este trabajo, por tantísimas trastadas y las que quedan. A los que están y a los que nos esperan.

A la familia Rivas Camacho, a Ángel y a Reyes que me tratan como a un hijo.

A Jose, mi compañero, amigo y hermano. He de agradecerle que me haya aguantado desde el primer día de clase de primero de biología hasta el último de vida de doctorando. Siempre sentado junto a mí ya sea en la banca de la facultad, la silla de la biblioteca, la poyata del laboratorio, la barra del bar, o el sofá de casa. Por haberse portado conmigo como si de un hermano se tratara. Por la convivencia de cada día, su paciencia, sus consejos, sus ánimos, por todos los años que hemos pasado para llegar a este punto, y por todo lo que hemos disfrutado, reído y soñado. Gracias por ser tal como eres, un tipo genial, un amigo de verdad.

A Macarena por su amor. Por arroparme siempre, por quererme tanto y tan bien. Por vivir esta tesis como si fuese la suya. Es la suya. Por su valentía, sus ganas, sus consejos y sus ánimos.

Por ser la mejor sensación,
Un lugar donde querer estar,
Por ser amiga, compañera y el amor mío.
Por toda tu magia.
Gracias.

A mis padres, a quienes va dedicada esta tesis. Por haberme contado una y otra vez la “historia del virus del SIDA” y por haberme contado una y otra vez como he de comportarme en esta vida. Por haber incentivado en mí la curiosidad y las ganas de aprender. Por hacerme valorar la honestidad, la sinceridad, el trabajo y el esfuerzo.

Por ser mis cimientos, mis pilares y mi techo.
Por haber trabajado sin descanso por mis ilusiones.
Por haberme regalado todo lo que soy.
Gracias padre. Gracias madre.

*No busques razones de piedra, no vas a encontrar más que hiedra intentando abarcar
campos yermos que tengo por dentro,
y barro y manchitas muy secas que dan que pensar, adoquines que están por pisar,
pisotones haciendo senderos...
...de buscar candela en la estela que haces al pasar, de estañarme a tu enjambre y líbar*

Fragmento de "En tu agujero". "Kutxi" Romero

