



FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

ÁREA: GENÉTICA

**Estudio y caracterización funcional de efectores
implicados en la interacción *Colletotrichum*
graminicola-maíz**

TESIS DOCTORAL

-José María Sanz Martín-

Dirigido por:

Dr. Michael R. Thon

Dra. Serenella A. Sukno

Salamanca, 2016



FACULTY OF BIOLOGY

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND GENETICS

AREA: GENETICS

**Study and functional characterization of
effectors implicated in the *Colletotrichum
graminicola*-maize interaction**

PhD. THESIS

-José María Sanz Martín-

Directed by:

Dr. Michael R. Thon

Dra. Serenella A. Sukno

Salamanca, 2016

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

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“Estudio y caracterización funcional de efectores implicados en la interacción *Colletotrichum graminicola*-maíz”**, 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. José María Sanz Martín**, bajo la dirección del Prof. **Dr. Michael R. Thon** y la **Dra. Serenella A. Sukno** 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 de septiembre de 2016

Fdo: Dr. D. Luis Román Fernández Lago

D. Michael Ronald Thon, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, y **Dña. Serenella Ana Sukno**, Personal Investigador Doctor del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada “**Estudio y caracterización funcional de efectores implicados en la interacción *Colletotrichum graminicola*-maíz**”, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por **D. José María Sanz Martín**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a de septiembre de 2016.

Fdo: Dr. D. Michael R. Thon

Fdo: Dra. Dña. Serenella A. Sukno

Fdo: D. José María Sanz Martín

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio 1 del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor Dr. Michael R. Thon y de la Dra. Serenella A. Sukno. Durante el desarrollo de la Tesis he disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Dentro del programa FPU realicé una Estancia Breve que complementó el trabajo presentado en esta Tesis en el laboratorio del Prof. Kelly D. Craven, en el centro de investigación “The Samuel Roberts Noble Foundation” situado en Ardmore, Oklahoma, Estados Unidos de América.

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

- Vargas WA, **Sanz-Martín JM**, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. (2012). Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. *Plant Physiology* 158: 1342–1358.
- Sukno SA, **Sanz-Martín JM**, González-Fuente M, Hiltbrunner J, Thon MR. (2014). First report of anthracnose stalk rot of maize caused by *Colletotrichum graminicola* in Switzerland. *Plant Disease* 98: 694–694.
- Baroncelli R, **Sanz-Martín JM**, Rech GE, Sukno SA, Thon MR. (2014). Draft genome sequence of *Colletotrichum sublineola*, a destructive pathogen of cultivated sorghum. *Genome Announcements* 2: e00540-14.
- Rech GE, **Sanz-Martín JM**, Anisimova M, Sukno SA, Thon MR. (2014). Natural selection on coding and noncoding DNA sequences is associated with virulence genes in a plant pathogenic fungus. *Genome Biology and Evolution* 6: 2368–2379.
- Vargas WA, **Sanz-Martín JM**, Rech GE, Armijos-Jaramillo VD, Rivera LP, Echeverria MM, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. (2016). A fungal effector with host nuclear localization and DNA-binding properties is required for maize anthracnose development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29: 83–95.
- **Sanz-Martín JM**, Postigo V, Mateos A, Albrecht B, Munkvold GP, Thon MR, Sukno SA. (2016). First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose stalk rot in the Alentejo region, Portugal. *Plant Disease* 100: 648-648.
- **Sanz-Martín JM**, Pacheco-Arjona JR, Bello-Rico V, Vargas WA, Monod M, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. (2016). A highly conserved metalloprotease effector enhances virulence in the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Pathology* 17: 1048-1062.
- **Sanz-Martín JM**, Baroncelli R, Netto MSB, Shoji J, Revilla-Temiño P, Craven KD, Thon MR, Sukno SA. A plant gene acquired by fungi aids in virulence (manuscript in preparation for Scientific Reports).
- Rech GE, **Sanz-Martín JM**, Baroncelli R, Sukno SA, Thon MR. The genome-wide mutational landscape of wild isolates of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* (manuscript in preparation for PLoS Pathogens).

«¿Qué es un científico, al fin y al cabo? Es un hombre curioso, mirando por una cerradura, la cerradura de la naturaleza, intentando descubrir lo que está pasando».

Jacques Yves Cousteau

INDICES

GENERAL INDEX

INDICES

GENERAL INDEX	III
INDEX OF FIGURES	IV
INDEX OF TABLES	VIII
ABBREVIATIONS AND TERMS OF COMMON USE	IX
SUMMARY	1
INTRODUCTION / INTRODUCCIÓN	16

Biología del género *Colletotrichum*

Estilo de vida y modelos de infección de *Colletotrichum*

Colletotrichum graminicola: el agente causal de la antracnosis del maíz

Ciclo de vida y sintomatología de *C. graminicola*

El sistema inmune de las plantas

La primera respuesta de defensa: reconocimiento de patrones microbianos y respuesta PTI

Segunda respuesta de defensa. Respuesta ETI

Efectores. Proteínas que manipulan el sistema de defensa del hospedador

Efectores localizados en el apoplasto de la planta

Efectores localizados en el citoplasma de la planta

Evolución de los efectores

Efectores en el género *Colletotrichum*

Metaloproteasas y serín proteasas relacionadas con la patogenicidad

Metaloproteasas

Serín proteasas

HYPOTHESES AND OBJECTIVES / HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 55

THESIS OUTLINE / ESQUEMA TEMÁTICO 57

CHAPTER I 59

A highly conserved metalloprotease effector enhances virulence in the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*

ABSTRACT

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

RESULTS

DISCUSSION

SUPPLEMENTARY MATERIAL

CHAPTER II 92

A plant gene acquired by fungi aids in virulence

ABSTRACT

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

RESULTS

DISCUSSION

SUPPLEMENTARY MATERIAL

CHAPTER III 124

Evolutionary and functional characterization of *Colletotrichum graminicola* effector CgEP3

ABSTRACT

INTRODUCTION
MATERIALS AND METHODS
RESULTS
DISCUSSION
SUPPLEMENTARY MATERIAL

CONCLUSIONS / CONCLUSIONES	147
APPENDIX. MATERIALS AND METHODS	151
REFERENCES	188
AGRADECIMIENTOS	218

INDEX OF FIGURES

Figure 1. Cladogram of *Colletotrichum spp.* and other 17 fungal spp. with sequenced genomes and phylogenetic tree of the *Colletotrichum* genus.

Figure 2. Disease symptoms caused by various species of *Colletotrichum*.

Figure 3. Variants of intracellular hemibiotrophy of *Colletotrichum* species.

Figure 4. Anthracnose symptoms in maize plants caused by *C. graminicola* infection.

Figure 5. *C. graminicola* cycle lifestyle.

Figure 6. Representative PRRs and their ligands.

Figure 7. Coevolutionary model of immune response caused by the interaction between plant and pathogens.

Figure 8. Overview of the diverse roles that fungal LysM effectors may play in fungal physiology.

Figure 9. Effectors and their role in the suppression of plant defences.

Figure 10. Coevolutionary principles driving effector and plant target evolution.

Figure 11. Structure of Cgfl.

Figure 12. Phylogenetic tree of fungalysins in the Sordariomycetes.

Figure 13. Phylogenetic analysis of *Cgfl* homologs in the Sordariomycetes.

Figure 14. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of *Cgfl* expression during anthracnose development.

Figure 15. Confocal microscopy images of pCgfl::gfp strain during plant infection.

Figure 16. Schematic representation of targeted gene replacement using the DelsGate method.

Figure 17. *In vitro* radial growth rate (a) and appressorium formation assays (b) with WT and *Cgfl* transformants.

Figure 18. Anthracnose leaf blight assays at 96 hpi performed with WT and $\Delta Cgfl$ transformants.

Figure 19. Live cell confocal imaging of maize leaves infected with WT and the $\Delta Cgfl$ transformants.

Figure 20. Live cell confocal imaging of inoculated maize roots using WT and $\Delta Cgfl36$ transformants.

Figure 21. Anthracnose leaf blight assay of the Pgpda::*Cgfl* transformant.

Figure 22. *In vitro* expression, proteolytic and chitinolytic activity assays.

Figure 23. Phylogenetic analysis of Ecp6 homologs.

Figure 24. Transcriptional profiles of Ecp6 homologs GLRG_02947 and GLRG_07767 and *Cgfl* using qRT-PCR.

Figure 25. Phylogenetic tree of *CPLS* homologs.

Figure 26. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of *CPLS* gene expression during anthracnose development.

Figure 27. Time-course experiment of *CPLS* expression using a *CPLS* promoter-driven green fluorescent protein (GFP).

Figure 28. Construction and verification of *CPLS* transformants.

Figure 29. Growth and development of *CPLS* transformants.

Figure 30. Conidia rate and appressoria formation rate assays of *CPLS* transformants.

Figure 31. Disease symptoms on leaves of the susceptible maize line Mo940 infected with *C. graminicola*.

Figure 32. Validation of transformants by qRT-PCR.

Figure 33. Quantification of fungal biomass in maize leaves and roots inoculated with *C. graminicola*.

Figure 34. Quantification of fungal biomass in maize leaves colonized by WT and Δ CPLS62 strains of *C. graminicola* at 48 hpi.

Figure 35. Confocal laser scanning microscopy image analysis of plants inoculated with *CPLS* transformant strains.

Figure 36. Relative expression of maize genes associated with PCD during infection.

Figure 37. Multiple sequence alignment of CgEP3 to the five most similar proteins from GenBank identified using BLAST.

Figure 38. Top 10 BLAST hits to the N-terminal NP-like domain and to the C-terminal domain of CgEP3.

Figure 39. Predicted three-dimensional structure view of the CgEP3 protein.

Figure 40. Phylogenetic analysis of CgEP3 homologs.

Figure 41. Quantitative real time PCR analysis and transcriptional fusions of *CgEP3*.

Figure 42. Development of gene knockout fungal strains.

Figure 43. . *In vitro* quantitative assays for the evaluation of mutant phenotypes.

Figure 44. Infection assays of WT and Δ *CgEP3* strains on maize leaves.

Figure 45. DNA ladders used in this work.

Figure 46. Image of pENTR/D-TOPO vector.

Figure 47. Image of pDNOR-A-HYG vector.

Figure 48. Image of pKW3 vector.

Figure 49. Image of pFPL-Gh vector.

Figure 50. Image of pKW4 vector.

Figure 51. Image of pRF-HUE vector.

Figure 52. DelsGate deletion construction methodology.

Figure 53. Schematic representation of the construction of a gene replacement cassette by double-joint PCR methodology.

Figure 54. Diagram of Gateway recombination cloning technology.

Figure 55. Diagram of USER Friendly cloning strategy for single step construction of replacement vectors.

INDEX OF TABLES

Table 1. Main effectors of filamentous plant-associated microbes described and their function.

Table 2. List of primers used in Chapter I.

Table 3. List of primers used in Chapter II.

Table 4. List of primers used in Chapter III.

Table 5. Media used for cultivation of microorganisms.

Table 6. Antibiotics used for the cultivation of *E. coli*.

Table 7. *E. coli* strains used in this work.

Table 8. Lasers used and the excitation and detection wavelength.

ABBREVIATIONS AND TERMS OF COMMON USE

AA	Amino acid
ABA	Abscisic acid
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosine triphosphate
Avr-(Protein)	Avirulence protein
bp	Base pairs
BSA	Bovine serum albumin
°C	Celsius grade
cDNA	Complementary DNA
CDP-star	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate
Cgfl	<i>Colletotrichum graminicola</i> fungalysin
cm	Centimeter
CPLS	<i>Colletotrichum</i> plant-like subtilisin
Ct	Threshold cycle
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
C-terminal	Carboxyterminal
Δ	Deletion/Delta
Da	Dalton
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH₂O	Doubled distilled water
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxynucleotide 5'-triphosphate
dpi	Days post inoculation

dUTP	2'-Deoxyuridine-5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ET	Ethylene
ETI	Effector-Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
Fig.	Figure
fw	Forward
gDNA	Genomic DNA
H₂O₂	Hydrogen peroxide
g	Gravitational acceleration
GFP	Green fluorescent protein
hpi	Hours post inoculation
HR	Hypersensitivity response
Hyg	Hygromycin
<i>in planta</i>	Inside the plant cell
JA	Jasmonic acid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	Liter
LRR	Leucine rich repeat
LysM	Lysine motifs
M	Molar (g/L)
MAMP	Microbe associated molecular pattern
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mb	Megabase
mg	Milligram
min	Minute(s)
mL	Millilitre
mM	Millimolar (mg/L)

mm	Millimeter
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
N	Normal
N-terminal	Aminoterminal
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NB-LRR	Nucleotide binding LRR receptors
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nucleotide
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethyleneglycol
pH	Potential of hydrogen
PR	Pathogenesis-related
PRR	Pattern recognition receptor
PI	Propidium iodide
PTI	PAMP triggered immunity
PTM	Posttranslational modification
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
R-protein	Resistance protein
rev / rv	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rounds per minute
RQ	Relative quantity of transcript
RT	Room temperature

RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
s / sec	Seconds
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Standard error
Sp.	Species
SSC	Saline-sodium citrate
TAE	Tris-Acetate + Na ₂ -EDTA
TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
Tm	Melting temperature
Tris	Trishydroxymethyl aminomethane
U	Unit (Enzyme activity)
V	Volts
WGA	Wheat germ agglutinin
µg	Microgram
µm	Micrometer
µM	Micromolar

SUMMARY

Colletotrichum graminicola is the causal agent of maize anthracnose, one of the most devastating diseases of this crop worldwide. Over the past few decades, there have been several outbreaks of anthracnose that have caused large reductions in maize crop yield and quality. This ascomycete fungus is characterized as having a hemibiotrophic life style. The infection cycle begins when the pathogen colonizes living tissues of the plant, establishing a biotrophic association. The fungal hyphae are separated from the host cell cytoplasm by a membrane. Subsequently, the hyphae change to a necrotrophic lifestyle characterized by the collapse of host cells and the appearance of anthracnose symptoms. Throughout this infection process, the fungus secretes effector proteins that are responsible for modulating or suppressing host defense responses. The production and release of effectors (which may be located in the intercellular space or inside the plant cell) is highly regulated.

One of the most interesting aspects of the pathogenic fungi infection mechanisms is the study of these effector proteins and their role in the host plant. In recent years, numerous studies have been focused on the field of fungal effector biology. Advances in high throughput sequencing technology has permitted the genomes of pathogenic fungi to be sequenced, uncovering hundreds of putative secreted proteins that possibly function as effectors. However, much work is still needed to experimentally validate all these candidates in the laboratory.

The aim of this study was to functionally characterize two proteases and a small species specific protein of *C. graminicola*, which were selected as putative effectors based on previous information obtained by our research group. In the first chapter of this thesis (**Chapter I**), we describe the characterization of a fungalysin metalloprotease as well as its involvement in pathogenicity. A previous study by Vargas et al. (2012) identified several fungal genes that were differentially expressed during the infection process by constructing a subtractive library of maize tissue inoculated with *C. graminicola*. One of the most interesting candidates that showed high expression during anthracnose was a fungalysin metalloprotease, named Cgfl (*Colletotrichum graminicola* fungalysin, GLRG_06543).

First, a characterization of both gene and encoded protein was conducted in order to determine the similarity to other fungal fungalyisin metalloproteases. Using bioinformatic tools we identified the typical functional domains of a metalloprotease belonging to the M36 family of fungalysins. The alignment of the mature protein to fungalysins of other fungal pathogens revealed strong sequence conservation in the catalytic HEXXH motif and the residues implicated in the protein-protein interaction. Also, we predicted the interaction between *Cgfl* and *Z. mays* class IV chitinase ACX37090.1 using the Phyre2 server. The analysis showed that there were three amino acidic residues necessary for the correct interaction between proteins. In order to determine the level of conservation of this protein among plant pathogenic fungi, a multigene phylogeny was performed with the most representative species of the Sordariomycetes class. As a result, a phylogenetic tree was obtained indicating that this fungalyisin is highly conserved among the Sordariomycetes class. Moreover, it was also identified that have occurred gene loss and duplication events during the evolution of the Sordariomycetes. Interestingly, most gene losses have occurred in fungal saprophytes such as *Neurospora* or *Chaetomium*, suggesting the possibility that this protease is a necessary requirement, among others, to infect plants.

Subsequently, we proceed to study the expression of *Cgfl* during *in vitro* and *in planta* growth conditions. We performed quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays using maize leaves inoculated with *C. graminicola* strain M1.001. The expression of *Cgfl* was quantified at 12-h intervals from 12 to 72 hours post-infection (hpi), with final samples taken at 8 days post-infection (dpi). Mycelium grown on potato dextrose broth (PDB) and conidia were also included. During the infection process, no *Cgfl* expression was evident at 36 hpi and reached a peak at 60 hpi when the majority of the hyphae are biotrophic. Furthermore, no *Cgfl* expression was evident in *in vitro*-cultured mycelium or in conidia, suggesting that *Cgfl* encodes an effector protein necessary for *in planta* pathogenicity. These results were corroborated by obtaining a *PCgfl::gfp* strain, which contained a fusion construct between the *Cgfl* promoter region and the green fluorescent protein (*gfp*) gene. Confocal microscopy observation of maize leaves inoculated with the *PCgfl::gfp* strain

revealed that the gene is expressed only in biotrophic hyphae around 60 hpi, confirming the results previously obtained by qRT-PCR analysis.

To determine the possible role of *Cgfl* as an effector during infection, deleted mutants in this gene were obtained using the DelsGate technique. Infection of both leaf and root tissues, showed a significant reduction in virulence of these mutants compared to the wild-type strain M1.001, thus confirming the involvement of *Cgfl* in the pathogenicity of *C. graminicola*. In addition, *in vitro* proteolytic activity studies were performed with *Cgfl* mutant strains, which showed reduced proteolytic activity as compared to the wild-type strain M1.001. Additionally, a study of *in planta* chitinase activity was carried out using an artificial substrate for chitinases. Plants inoculated with the *Cgfl* mutant strains showed increased chitinase activity compared to plants inoculated with the wild-type strain M1.001. Together, these results suggest that *Cgfl* is a fungalysin metalloprotease involved in the degradation of plant chitinases, as previously observed in other phytopathogenic fungi.

As a final objective, we wanted to determine the relationship of *Cgfl* to other fungal effectors involved in host chitin-triggered immunity (CTI). For this, a BLAST search was performed in order to find homologs of *Ecp6* in the genome of *C. graminicola*. *Ecp6* is a known fungal effector involved in suppressing the host CTI response. As a result, we identified two genes with high similarity to other previously described *Ecp6* homologs in various phytopathogenic species. Finally, qRT-PCR analyses of the two *Ecp6* homologous genes in *C. graminicola* showed that these genes are differentially expressed during the early stage of biotrophic anthracnose. Thus, we suggest that *C. graminicola* employs several effectors, both fungalysin and *Ecp6* homologs, to suppress the plant CTI defense response.

In the second chapter (**Chapter II**), we analyze a *C. graminicola* subtilisin as possible effector implicated in the virulence process during plant infection. This is a subtilisin-like protease belonging to the S8A family of subtilases and was identified in a previous work by our research group (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a). The gene shows evidence of horizontal gene transfer from plants to a *Colletotrichum* ancestor and we named it CPLS (**C**olletotrichum **p**lant-like **s**ubtilisin, GLRG_05578).

First, we performed a phylogenetic analysis of CPLS homologs. The analysis showed that all *Colletotrichum* species had CPLS homologs and some species such as *C. gloeosporioides* or *C. orbiculare* possessed two copies of this gene in their genomes. We also detected CPLS homologs in members of only one other fungal genus, *Diaporthe*. Since both genera are members of the Sordariomycetes and are relatively closely related, it is probable that the HGT event occurred in a common ancestor of both genera.

In order to study the expression of *CPLS* during *in planta* infection and during *in vitro* growth of the fungus, a qRT-PCR analysis was performed using the experimental conditions described in Chapter I. We found that *CPLS* expression starts at 12 hpi, reaching a maximum peak at 48 hpi during biotrophic stage and then decreases to 96 hpi. In contrast, very low levels of *CPLS* expression were detected in mycelium and conidia cultured *in vitro*. These results were further confirmed by performing inoculations with a *PCPLS::gfp* strain of *C. graminicola*, which contained a fusion construct between the promoter region of the *CPLS* gene and the *gfp* gene.

Subsequently, we obtained *CPLS* deletion mutant strains (Δ *CPLS*) using the double-joint PCR methodology. The Δ *CPLS* transformants were tested for mycelial growth, both in solid and liquid media, sporulation and appressorium formation and no significant differences were detected compared to the wild-type strain M1.001. Also, no differences in hyphal morphology of the Δ *CPLS* strains with respect to the wild-type strain M1.001 were detected by staining with WGA / FITC and subsequent observation with confocal microscopy. Inoculation with Δ *CPLS* strains caused a significant increase in lesion sizes as compared to the wild-type strain M1.001 at 96 hpi, which is consistent with a hypervirulent phenotype. There are few cases of null mutants causing a hypervirulent phenotype in fungal plant pathogens and it has been suggested that, in the case of biotrophs, hypervirulence may indicate that the protein attenuates fungal growth, in order to prevent host cell death. Furthermore Δ *CPLS* mutant strains exhibit reduced biomass accumulation in maize leaves, indicating that the CPLS protein contributes to fungal biomass accumulation during the biotrophic and necrotrophic growth stages. Moreover, no differences between the Δ *CPLS* strain and the wild-type strain M1.001 were detected during root infection, indicating that CPLS is

a tissue-specific effector and acts only during infection of leaves. To determine if the *CPLS* gene is related to plant programmed cell death (PCD) processes, we performed qRT-PCR analyses of two maize genes encoding CC-NLR immune receptor proteins involved in PCD and HR defensive responses. Results showed that these two genes are suppressed during the early stages of the infection with the wild-type M1.001 strain and are induced at 24 hpi and 96 hpi of the infection with Δ *CPLS* strain. Thus, it is conceivable that *CPLS* would be involved in the suppression of plant PCD processes, thereby facilitating controlled host colonization.

Based on the results obtained in this chapter, we suggest that the *CPLS* subtilisin protease is a conserved effector among *Colletotrichum* species, and is involved in virulence. Furthermore, this effector is tissue-specific as it is expressed only during infection in leaves. Finally, evidence suggests that *CPLS* may be involved in the molecular signaling mechanisms related to plant PCD and HR response. However, a study of protein localization within the plant and the precise interaction with other host molecules is needed to fully understand its function and mechanism of action.

In the third chapter (**Chapter III**), the evolutionary analysis and functional characterization of the CgEP3 protein (*Colletotrichum graminicola* extracellular protein 3), encoded by the locus GLRG_00879 of *C. graminicola* is described. Previously, we performed a genome-wide survey to identify *C. graminicola* effector proteins that are predicted to encode a secretion signal and that have evidence of nuclear localization and/or DNA binding domains (Vargas *et al.*, 2016). We identified the CgEP3 protein, a small species specific protein of unknown function. CgEP3 has no similarity to previously described pathogenicity factors and there are no proteins with similar structure in other fungal species.

The N-terminal domain contains a signal peptide that overlaps a domain with similarity to nucleoside phosphorylases (NP) domains, although the protein appears to lack the full-length NP domain that is found in other fungal proteins. The C-terminal region has no similarity to any known functional domains, but does have similarity to proteins with NP domains but to a region outside of the NP and other characterized domains. Sequence alignments with NP enzymes revealed that the two domains are

subject to asymmetric evolutionary pressures. The NP-like domain appears to have more conserved function reflected by the accumulation of fewer amino acid changes, while the C-terminal domain is less conserved and evolved more quickly. We found that the predicted isoelectric points (pI) of the two domains are extremely different. The pI of the N-terminal region is acidic (4.62), while the pI of the C-terminal region is highly basic (11.3), thus suggesting a possible DNA binding role for the C-terminal domain. We also found a characteristic pattern of basic arginine residues that may be crucial the recognition of the target.

Subsequently, we attempted to model the tertiary structure of the protein using the protein sequence with and without the signal peptide coding sequence. We failed to find any high confident alignments by removing the signal peptide at the predicted cleavage site so we performed a second search using the full length protein sequence. The search revealed that 40% of the amino acids, localized in the N-terminal region, were modeled with 97.8% confidence by aligning to the highest scoring template, a 5'-methylthioadenosine/s-adenosylhomocysteine nucleosidase from *A. thaliana*. However, no matches were found for the basic C-terminal region of the protein. We performed a BLASTP search to compare CgEP3 to the proteomes of other *C. graminicola* isolates previously sequenced by our group, and found CgEP3 homologs in all of the isolates, indicating that this protein is well conserved in *C. graminicola*. Also, we constructed a phylogenetic tree of the 100 most similar proteins identified in a BLASTP search of the nr database, showing that CgEP3 clusters with sequences from other *Colletotrichum* spp., as well as species of the closely related genera *Verticillium* and *Fusarium*. Moreover, the phylogeny shows that several gene duplications and losses have occurred during the evolution of this gene family. Also, we identified several proteins that, like CgEP3, encode a secretion signal peptide that overlaps the N-terminus of the NP domain. This indicates that CgEP3 is a descendant of a subfamily of secreted NPs which have been lost in many species of fungi, but maintained in *Aspergillus*, *Talaromyces* and *Emonsia parva*.

In order to study the *CgEP3* gene expression during infection and during *in vitro* growth of the fungus, we performed a qRT-PCR analysis using the experimental conditions described above in Chapter I and II. We found that the *CgEP3* gene

expression increases at 12 and 24 hpi, during the early stages of infection, and then decreases. In addition, high levels of *CgEP3* gene expression were detected in conidia grown in saprophytic conditions. These results were further confirmed by performing inoculations with a *C. graminicola* *PCgEP3::gfp* strain, which contained a fusion construct between the promoter region of the *CgEP3* gene and the *gfp* gene. Thus, GFP fluorescence was observed in both conidia and appressoria during the early stages of infection in maize leaves.

Finally, to further investigate the role of CgEP3 during host infection, we obtained *CgEP3* deletion strains using the Delsgate method. The knockout mutant strains exhibit reduced lesion sizes as compared to the WT strain at 72 hpi. We also performed quantification of fungal biomass during infection. Fungal biomass was significantly reduced in plants inoculated with the $\Delta CgEP3$ strains, indicating that CgEP3 is important for the colonization process of *C. graminicola*. Together, these results suggest that CgEP3 is an effector with a role during the early stages of the infection. Moreover, it is also an example of effector evolution through the acquisition of new protein functions in an existing gene family.

Colletotrichum graminicola es el agente causal de la antracnosis del maíz, una de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial que sufre este cultivo de enorme interés agroalimentario. A lo largo de las últimas décadas se han producido varias epidemias de antracnosis que han provocado grandes pérdidas en el rendimiento y calidad de las cosechas. Este hongo ascomiceto es un patógeno que desarrolla un estilo de vida hemibiotrofo. Su ciclo de infección comienza colonizando tejidos vivos de la planta, estableciendo una asociación en la cual forma hifas biotróficas que se mantienen separadas del citoplasma de la célula huésped a través de una membrana. Posteriormente, estas hifas cambian a un estilo de vida necrotrófico caracterizado por el colapso de la célula huésped y la aparición de los síntomas de la antracnosis. Durante todo este proceso de infección, el hongo secreta cientos de proteínas efectoras que se encargan de modular o suprimir las respuestas defensivas del huésped. La producción y liberación de efectores (que pueden localizarse en el espacio intercelular o en el interior de la célula vegetal) se encuentra muy regulada, ya que es necesario que lleven a cabo su función en el lugar y en el momento adecuado.

Uno de los aspectos más interesantes de los mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos es el estudio de estas proteínas efectoras y la función que desempeñan en su huésped, la planta. En los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en el campo de la biología de los efectores fúngicos. Gracias a los avances que se han dado en las tecnologías de secuenciación masiva de genomas, se han descubierto *in silico* cientos de proteínas secretadas putativas con posible implicación en la patogenicidad. Sin embargo, aún se necesita mucho trabajo para validar experimentalmente todos estos candidatos en el laboratorio.

El objetivo de este estudio consistió en caracterizar funcionalmente dos proteasas y una proteína pequeña específica de especie de *C. graminicola*, las cuales fueron seleccionadas como presumibles efectores putativos en base a la información obtenida en análisis previos realizados por nuestro grupo de investigación.

En el primer capítulo de esta Tesis (**Chapter I**) se describen los procedimientos llevados a cabo para establecer la caracterización de una metaloproteasa fungalisina así como también su implicación en el desarrollo del proceso de patogenicidad. El

estudio previo de (Vargas *et al.*, 2012) identificó, mediante la realización de una librería sustractiva de tejido de maíz inoculado con *C. graminicola*, la expresión diferencial de varios genes fúngicos durante el proceso de infección. Uno de los candidatos más interesantes que además mostró una elevada expresión durante la antracnosis fue una metaloproteasa fungalisina, a la cual denominamos Cgfl (*Colletotrichum graminicola* fungalysin, GLRG_06543).

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de caracterización tanto del gen como de la proteína codificante y sus dominios funcionales para determinar la similitud con otras metaloproteasas fungalisinas de hongos. Mediante herramientas bioinformáticas como InterProScan se identificaron los dominios funcionales típicos de una metaloproteasa fungalisina de la familia M36, y el alineamiento tipo BLAST con otras fungalisinas de hongos mostró un alto porcentaje de similaridad entre ellas, especialmente en el motivo catalítico HEXXH y en los residuos implicados en la interacción proteína-proteína. Además, se llevó a cabo una predicción de la interacción entre la Cgfl y la quitinasa de maíz de clase IV ACX37090.1, utilizando el servidor informático Phyre2. El análisis demostró que existían tres residuos aminoacídicos necesarios para la correcta interacción entre las proteínas. Con el objetivo de determinar el nivel de conservación de esta proteína entre los hongos fitopatógenos, se realizó una filogenia multigénica con las especies más representativas de los hongos de la clase Sordariomycetes. Como resultado se obtuvo un árbol filogenético que indica que esta fungalisina se encuentra muy conservada entre los hongos de la clase Sordariomycetes. Por otra parte, también se identificó que a lo largo de la evolución se han producido eventos de pérdida y duplicación de este gen. De manera interesante, la mayoría de las pérdidas génicas se han dado en especies de hongos saprófitos como *Neurospora* o *Chaetomium*, lo que sugiere la posibilidad de que esta proteasa sea un requisito necesario, entre otros muchos, para adquirir la capacidad de infectar plantas.

Una vez confirmado el hecho de que se trataba de una metaloproteasa fungalisina, se procedió a estudiar su expresión tanto *in vitro* como *in vivo*. Se realizaron experimentos de qRT-PCR con tejido de maíz inoculado con *C. graminicola* a diferentes tiempos desde 12 horas post-inoculación (hpi) hasta 72 hpi analizando

muestras recolectadas a intervalos de 12 horas, y testando también muestras a 8 días post-inoculación (dpi). Además, también se analizaron dos condiciones de crecimiento *in vitro*: micelio y esporas crecidos de manera saprofítica. Los resultados *in vivo* mostraron que el gen *Cgfl* se expresa de manera evidente a las 36 hpi y alcanza un máximo de expresión a las 60 hpi, cuando la mayor parte de las hifas que colonizan la planta son biotróficas. Por otra parte, no se detectó expresión de *Cgfl* durante el crecimiento *in vitro* del hongo, lo cual sugiere que este gen codificaría una proteína efectora necesaria para la patogenicidad *in planta*. Estos resultados se corroboraron con la obtención de una cepa de *C. graminicola* denominada *PCgfl::gfp* que contenía una construcción de fusión entre la región promotora de *Cgfl* y la proteína verde fluorescente (*gfp*). La observación mediante microscopía confocal de hojas de maíz inoculadas con esta cepa *PCgfl::gfp* reveló que el gen *Cgfl* se expresa únicamente en hifas biotróficas alrededor de las 60 hpi, confirmando los resultados obtenidos anteriormente con el análisis de qRT-PCR.

Para determinar el posible papel de *Cgfl* como efector durante el proceso de infección, se obtuvieron mutantes delecionados en este gen mediante la técnica DelsGate. Los resultados de infección tanto en hoja como en raíz mostraron una reducción significativa en la virulencia de estos mutantes con respecto a la cepa silvestre M1.001, confirmando de esta manera la implicación de *Cgfl* en la patogenicidad de *C. graminicola*. Además, se llevaron a cabo estudios de actividad endoproteolítica *in vitro* con los mutantes de *Cgfl*, los cuales mostraron una menor actividad proteolítica respecto a la cepa silvestre M1.001. Adicionalmente, se realizó un estudio de actividad quitinasa *in planta* utilizando un sustrato artificial para quitinasas. De esta forma, se observó que las muestras de plantas inoculadas con el mutante de *Cgfl* mostraron una actividad quitinasa mayor que aquellas muestras de plantas inoculadas con la cepa silvestre M1.001. En conjunto, estos resultados sugieren que *Cgfl* es una metaloproteasa fungalisina implicada en la degradación de quitinasas de planta, como ya se había observado anteriormente en otros hongos fitopatógenos.

Como objetivo final, se deseaba determinar la relación de la *Cgfl* con otros efectores fúngicos implicados en combatir la respuesta inmunitaria de la planta relacionada con la quitina (Chitin-triggered immunity, CTI). Para ello, se realizó una búsqueda BLAST

para encontrar homólogos de Ecp6, un conocido efector fúngico implicado en suprimir la respuesta CTI, en el genoma de *C. graminicola* y se identificaron dos genes, los cuales mostraban alta similaridad con otros homólogos de Ecp6 previamente descritos en diversas especies fitopatógenas. Por último, el análisis mediante qRT-PCR de los dos genes homólogos de Ecp6 en *C. graminicola* demostró que estos genes se expresan de forma diferencial durante la etapa biotrófica temprana del proceso de antracnosis. De esta manera, sugerimos que *C. graminicola* emplea diversos efectores, tanto la fungalisina como los homólogos de Ecp6, para suprimir la respuesta de defensa de la planta relacionada con la quitina.

En el segundo capítulo (**Chapter II**) se analiza la implicación de una subtilisina de *C. graminicola* como posible efector durante la infección en la planta. Esta subtilisina es una serín-proteasa de la familia S8A, la cual fue identificada en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a) como un gen candidato que sufrió un evento de transferencia horizontal desde las plantas hacia un ancestro del género *Colletotrichum*. Debido a esta razón, se denominó a esta subtilisina como CPLS (*Colletotrichum* plant-like subtilisin, GLRG_05578).

En primer lugar, se llevaron a cabo análisis filogenéticos para tratar de determinar la distribución y el número de copias del gen *CPLS* entre las especies de hongos ascomicetos. Además, en el análisis también se incluyeron distintas especies representativas de plantas y animales. De este modo, los resultados mostraron que todas las especies de *Colletotrichum* presentaban homólogos de *CPLS* y algunas especies como *C. orbiculare* o *C. gloeosporioides* poseían dos copias de este gen en su genoma. Mediante este análisis filogenético también se detectó que únicamente otro género fúngico denominado *Diaporthe*, poseía homólogos de *CPLS*. Este género se clasifica dentro de la clase de los Sordariomicetes y se encuentra relativamente cercano a *Colletotrichum*, con lo cual es posible que el evento de transferencia horizontal del gen *CPLS* se diera en un ancestro común de ambos géneros.

Con el objetivo de determinar la expresión del gen *CPLS* durante el proceso de infección *in planta* y durante el crecimiento *in vitro* del hongo, se realizó un análisis mediante qRT-PCR utilizando las diferentes condiciones experimentales

anteriormente descritas en el capítulo I. Se observó que el gen *CPLS* comienza su expresión a las 12 hpi, alcanza su máximo de expresión durante la etapa biotrófica en torno a las 48 hpi, y posteriormente disminuye hasta llegar a las 96 hpi. Además, se detectaron niveles bajos de expresión del gen *CPLS* en micelio y esporas crecidas en condiciones saprofitas. Estos resultados fueron confirmados adicionalmente realizando inoculaciones con una cepa de *C. graminicola* denominada *PCPLS::gfp*, la cual contenía una construcción de fusión entre la región promotora del gen *CPLS* y el gen codificante de la *gfp*.

Posteriormente, se obtuvieron cepas mutantes delecionadas en el gen *CPLS* (Δ *CPLS*) utilizando para ello la metodología double-joint PCR. Las cepas delecionadas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante diversos análisis y no mostraron ninguna diferencia en crecimiento, esporulación o formación de apresorios *in vitro* e *in vivo* con respecto a la cepa silvestre M1.001. Además, también se comprobó mediante doble tinción con WGA-AF488/Yoduro de propidio y posterior observación con microscopía confocal, el hecho de que no existían diferencias en la morfología de las hifas de las cepas Δ *CPLS* durante su crecimiento *in planta* a 48 hpi y a 96 hpi, con respecto a la cepa silvestre M1.001.

La inoculación de la cepa Δ *CPLS* en hojas de maíz provocó un aumento significativo en el tamaño de las lesiones producidas a las 96 hpi con respecto a la cepa silvestre M1.001, lo cual es consistente con un fenotipo de hipervirulencia. No se conocen demasiados casos de efectores fúngicos cuya deleción provoque un fenotipo de hipervirulencia y se ha sugerido que posiblemente estos efectores se relacionen con una atenuación de la proliferación dentro del huésped, de forma que el patógeno mantenga un balance controlado y evite así la inducción de la muerte celular en el huésped. Además los mutantes de la cepa Δ *CPLS* presentan una cantidad reducida de biomasa en hoja de maíz, lo cual indica que la proteína *CPLS* contribuye a la acumulación de biomasa durante la etapa biotrófica y necrotrófica de crecimiento del hongo. Por otra parte, no se detectaron diferencias durante la infección en raíz entre la cepa Δ *CPLS* y la cepa silvestre M1.001, lo cual indica que este efector es específico de tejido y actúa únicamente durante la infección en las hojas. Para intentar determinar si el gen *CPLS* se encuentra relacionado con los procesos de muerte celular programada

(PCD) en la planta, realizamos análisis mediante qRT-PCR de dos genes de maíz codificantes de proteínas receptoras inmunes tipo CC-NLR implicadas en PCD y respuesta hipersensible (HR). Los resultados mostraron que estos dos genes se encuentran suprimidos durante las primeras etapas de la infección con la cepa silvestre M1.001 e inducidos durante las 24 hpi y las 96 hpi de la infección con la cepa Δ CPLS. De este modo, es posible pensar que la CPLS estaría implicada en la supresión de los procesos de PCD en la planta, favoreciendo con ello una colonización controlada sobre el huésped.

En base a los resultados obtenidos en el presente capítulo se sugiere que la proteasa subtilisina CPLS es un efector conservado entre las especies de *Colletotrichum*, con implicación en la virulencia. Además, este efector posee propiedades órgano-específicas puesto que se expresa únicamente durante la infección en las hojas. Finalmente, las evidencias sugieren que la CPLS podría estar involucrada actuando en los mecanismos moleculares de señalización relacionados con la PCD y la respuesta HR de la planta. Sin embargo, se necesita profundizar más en el estudio de la localización de la proteína dentro de la planta y en la precisa interacción con otras moléculas del huésped para comprender totalmente su función y su mecanismo de acción.

En el tercer capítulo de este trabajo (**Chapter III**), se describe el análisis evolutivo y caracterización funcional de la proteína CgEP3 (*Colletotrichum graminicola* extracellular protein 3), codificada por el locus GLRG_00879 de *C. graminicola*. Este gen fue identificado en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Vargas *et al.*, 2016), en el que se realizó una búsqueda general de proteínas efectoras en el genoma de *C. graminicola* que codificaran una señal de secreción y que mostraran evidencias de localización nuclear y/o dominios de unión a ADN. Así se detectó CgEP3, una pequeña proteína específica de especie y con función desconocida. Esta proteína no posee ninguna similitud con factores de patogenicidad previamente descritos y además no existen proteínas estructuralmente similares en otras especies de hongos. La proteína consta de un dominio N-terminal que contiene un péptido señal, el cual solapa con una región que muestra semejanza a los dominios N-terminal de las nucleósido fosforilasas (NP), pero carece de la longitud completa del dominio NP

encontrado en las proteínas de otros hongos. La región C-terminal no muestra similitud con ningún dominio funcional conocido, pero sí tiene similitud con alguna región de proteínas con dominios NP. Este hecho indica que los dos dominios están sujetos a presiones evolutivas asimétricas. El dominio NP, con una función más conservada, refleja menos acumulación de cambios, mientras que el dominio C-terminal se encuentra menos conservado y evolucionó más rápidamente. Se observó que las dos regiones poseen puntos isoeléctricos (pI) bastante diferentes entre sí. Mientras que la región N-terminal posee un pI ácido de 4,62, la región C-terminal muestra un pI altamente básico de 11,3, lo cual sugiere un posible rol de unión al ADN. Además también se observó un patrón característico de disposición de argininas repetidas en tándem, que podría guardar relación con el reconocimiento del sustrato. Posteriormente, se llevó a cabo una predicción de la estructura terciaria de la proteína utilizando la secuencia de la proteína con y sin la secuencia codificante para el péptido señal. Se observó que únicamente se obtenían resultados congruentes utilizando la secuencia completa de la proteína, y los resultados revelaron una semejanza del 97.8% del 40% de la proteína (la región N-terminal) con la proteína 5'-metiltioadenosina/s-adenosilhomocisteína nucleosidasa de *A. thaliana*. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado para predicción de la región C-terminal de la proteína.

Posteriormente se realizó una búsqueda BLASTP en los genomas de otros siete aislados de *C. graminicola* previamente secuenciados, encontrando homólogos de CgEP3 en todos ellos. También realizamos un análisis filogenético con las 100 proteínas más similares encontradas mediante búsqueda BLASTP en la base de datos de proteínas nr. El árbol filogenético mostró que CgEP3 se agrupa con los homólogos de otras especies de *Colletotrichum*, *Verticillium* y *Fusarium*, encontrando además otras proteínas que, como CgEP3, muestran solapamiento de su péptido señal con la región N-terminal del dominio NP. Además, la filogenia mostró que se han producido varios eventos de duplicación y pérdida a lo largo de la evolución de esta familia de genes. Todo ello indica que CgEP3 descende de un subfamilia de proteínas secretadas NP, perdida en muchas especies de hongos pero mantenida aún en otros como *Aspergillus*, *Talaromyces* o *Emonsia parva*.

Con el objetivo de determinar la expresión del gen *CgEP3* durante el proceso de infección *in planta* y durante el crecimiento *in vitro* del hongo, se realizó un análisis mediante RT-qPCR utilizando las diferentes condiciones experimentales anteriormente descritas en el capítulo I y II. Se observó que el gen *CgEP3* alcanza su máximo de expresión a las 12 y 24 hpi, durante las etapas tempranas de la infección, y posteriormente disminuye. Además, se detectaron altos niveles de expresión del gen *CgEP3* en esporas crecidas en condiciones saprofiticas. Estos resultados fueron confirmados adicionalmente realizando inoculaciones con una cepa de *C. graminicola* denominada *PCgEP3::gfp*, la cual contenía una construcción de fusión entre la región promotora del gen *CgEP3* y el gen codificante de la *gfp*. Así, se observó fluorescencia GFP tanto en esporas como en apresorios durante las primeras etapas de la infección en hoja de maíz.

Por último, para determinar si *CgEP3* se comporta como un factor de patogenicidad en *C. graminicola*, se obtuvieron cepas delecionadas en el gen *CgEP3* utilizando la técnica DelsGate. Los resultados de la infección en hoja de maíz a 72 hpi mostraron una reducción significativa en la virulencia de estas cepas delecionadas con respecto a la cepa silvestre M1.001, confirmando de esta manera la implicación de *CgEP3* en la patogenicidad de *C. graminicola*. Además, también se llevaron a cabo estudios de cuantificación de la biomasa fúngica durante la infección. Así, los resultados obtenidos en plantas a 72 hpi mostraron que las cepas delecionadas en el gen *CgEP3* llevaban a cabo una menor colonización sobre el tejido de la planta en relación a la colonización producida por la cepa silvestre M1.001. En conjunto, estos resultados sugieren que *CgEP3* se comporta como un efector, actuando durante las etapas más tempranas del proceso de antracnosis. Además, también es ejemplo de cómo una proteína efectora puede evolucionar a partir de una familia génica existente, mediante la adquisición de nuevas funciones.

INTRODUCTION

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, las plantas permanecen rodeadas constantemente de una gran variedad de organismos microbianos, algunos de los cuales son capaces de provocar enfermedades. De entre todos ellos, los hongos son los patógenos que causan las pérdidas económicas más importantes a nivel mundial (Agrios, 2005). Se estima que aproximadamente el 40% de la producción agrícola se pierde cada año debido principalmente a las infecciones fúngicas (Oerke, 2006; Cuming, 2009; Flood, 2010; Fisher *et al.*, 2012) y con las consecuencias del creciente cambio climático se espera que estas pérdidas se incrementen aún más (Gregory *et al.*, 2009; Mba *et al.*, 2012). De las más de 100.000 especies de hongos descritos hasta el momento, más de 10.000 especies pueden causar enfermedades en las plantas. Estos hongos fitopatógenos presentan diversos estilos de vida y han desarrollado diferentes estrategias para interactuar con sus huéspedes (Agrios, 2005). Los estilos de vida pueden dividirse en tres grupos: biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos. En el estilo de vida biotrófico, el patógeno necesita que las células de su hospedador se mantengan vivas para completar su ciclo de vida total o parcialmente, causando daños relativamente pequeños en su pared celular pero manteniendo la viabilidad del hospedador para adquirir nutrientes (Lewis, 1973). Estos patógenos son capaces de manipular al huésped sin causarle ningún daño y comprenden especies de los géneros *Cladosporium*, *Puccinia* o *Ustilago* (Horbach *et al.*, 2011). En el estilo de vida necrotrófico, el patógeno mata las células y tejidos de su hospedador mediante la secreción de toxinas y enzimas degradadoras de pared celular y posteriormente se alimenta saprofiticamente de esta materia orgánica muerta (Lewis, 1973). Hongos necrotróficos son las especies que forman parte de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* o *Verticillium* (Mendgen & Hahn, 2002; Horbach *et al.*, 2011). En la interacción hemibiotrófica, el patógeno parasita los tejidos vivos durante un periodo variable y posteriormente cambia su estilo de vida a necrotrófico (Luttrell, 1974; Bailey *et al.*, 1992; Parbery, 1996). Ejemplos de organismos con un estilo de vida hemibiotrófico son las especies de *Magnaporthe*, *Phytophthora* o *Zymoseptoria* (Horbach *et al.*, 2011). Las diferencias en el estilo de vida, así como en los caracteres morfológicos hacen que sean unos patógenos difíciles de controlar por el hombre.

Para combatir las infecciones causadas por hongos, los agricultores utilizan múltiples tratamientos fungicidas, lo cual afecta negativamente al medio ambiente. Además, las prácticas agrícolas actuales se basan en la siembra de semillas de un mismo genotipo en enormes extensiones de terreno. Esta reducción en la diversidad genética de los cultivos promueve la selección de aislados fúngicos que sean capaces de adquirir resistencia rápidamente. Ello desemboca en un proceso continuo de desarrollo e introducción de nuevas semillas con caracteres resistentes mediante mejoramiento genético (Strable & Scanlon, 2009). Entender estas estrategias de infección, los detalles de las respuestas de defensa de las plantas, así como el mecanismo de interacción entre ambos para formar una asociación compatible o evitarla, es de gran importancia para resolver los problemas biológicos y económicos que causan.

Biología del género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un hongo filamentoso que pertenece a la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, subclase Hypocreomycetidae, orden Glomerellaceae, familia Glomerellales (Réblová *et al.*, 2011; 'Impacts of the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. APS Features', 2013). El estado sexual tradicionalmente se ha denominado *Glomerella*, aunque la mayoría de especies de *Colletotrichum* se han observado principalmente en estado vegetativo o asexual. Se utiliza el concepto filogenético de especies para clasificar estos hongos y se han establecido varios clados monofiléticos denominados agregados de especies para clasificar los géneros (O'Connell *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2012). Éstos se definen por el nombre y los atributos de las especies más representativas del grupo y hasta la fecha se han descrito nueve agregados basados en filogenias multigénicas: graminicola, gloeosporioides, acutatum, orbiculare, boninense, truncatum, destructivum, dematium y spaethianum (Cannon *et al.*, 2012). En la **Figura 1** se muestra un cladograma entre *Colletotrichum spp.* y otras especies de hongos secuenciadas.

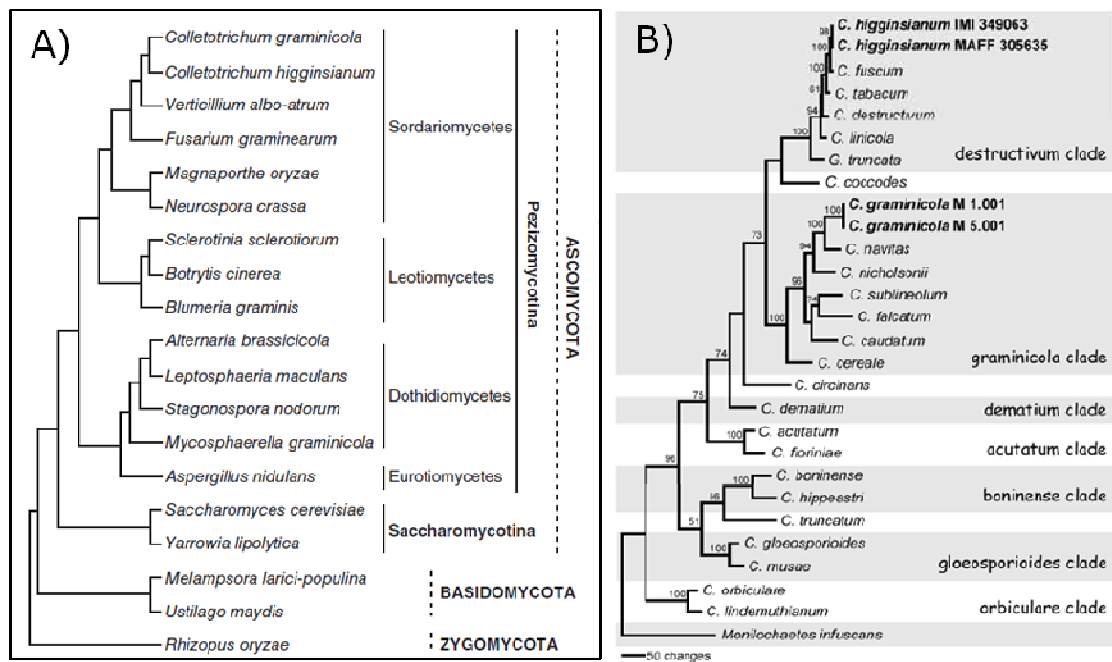


Figura 1: A) Cladograma que muestra las relaciones filogenéticas entre *Colletotrichum* spp. y otras 17 especies de hongos con genomas secuenciados completamente. **B)** Árbol filogenético de varias especies del género *Colletotrichum* y su división en clados. Imágenes tomadas de (O'Connell *et al.*, 2012).

Su distribución es predominantemente tropical y subtropical aunque se encuentra también en climas más templados. Existen numerosas especies dentro de este género que producen enfermedades a una gran variedad de cultivos agrícolas tanto monocotiledóneos como dicotiledóneos, causando grandes pérdidas económicas. Destacan algunos cultivos tan extendidos mundialmente como maíz, judía, patata, pimiento, café o cucurbitáceas (Bailey *et al.*, 1992; Dickman, 2000; Cannon *et al.*, 2012). *Colletotrichum* también es causa de importantes enfermedades post-cosecha en frutos de alto valor comercial ya recogidos y almacenados como fresa, mango, avocado, banana y multitud de cítricos (Prusky, 1996; Prusky *et al.*, 2000). Además, es responsable de pérdidas millonarias en cultivos con gran interés bioenergético como sorgo, caña de azúcar, pasto varilla (*Panicum virgatum*) o miscanthus (Crouch *et al.*, 2014). También infectan un amplio rango de especies herbáceas sin interés comercial que se encuentran presentes en bosques, desiertos o praderas, poniendo de manifiesto su gran potencial para dañar multitud de ecosistemas naturales (Crouch *et al.*, 2014). Como patógenos de las plantas, se describen principalmente causantes de

enfermedades de antracnosis. Los síntomas de antracnosis incluyen lesiones necróticas limitadas y a menudo hundidas en hojas, tallos, flores y frutos, así como podredumbre en tallos, coronas y semillas (Agrios, 2005). En la **Figura 2** se muestran síntomas de antracnosis producidos por especies del género *Colletotrichum* en diferentes hospedadores.

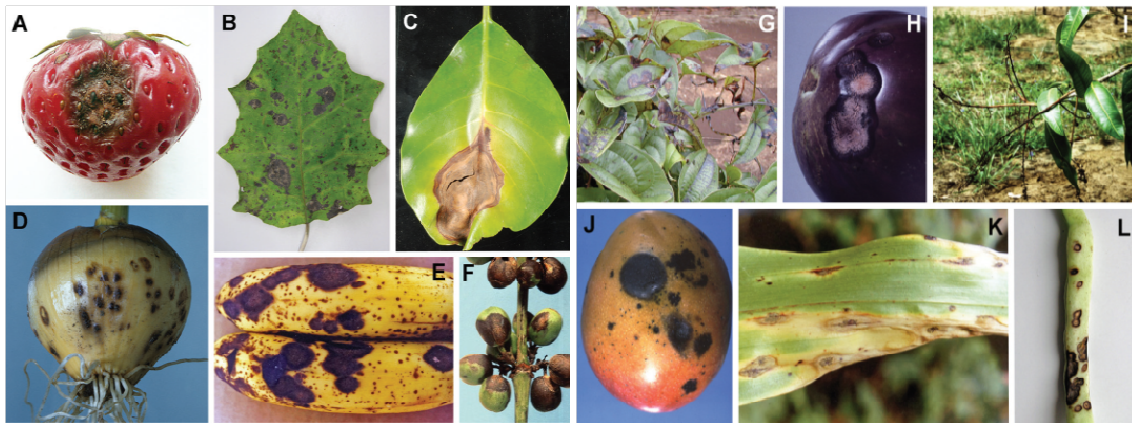


Figura 2: Síntomas de enfermedades causadas por distintas especies de *Colletotrichum*. **A)** antracnosis en fresa acusado por *C. nymphaeae*. **B)** síntomas de antracnosis foliar en *Brachyglottis repanda* causado por *C. beeveri*. **C)** antracnosis en hojas de *Tecomathe speciosa* causado por *C. boninense*. **D)** antracnosis en bulbo de cebolla causado por *C. circinans*. **E)** antracnosis en banana causado por *C. musae*. **F)** enfermedad en granos de café causada por *C. kahawae* subsp. *kahawae*. **G)** antracnosis en hoja de batata causado por *C. gloeosporioides*. **H)** antracnosis en fruto de berenjena causado por *C. gloeosporioides*. **I y J)** antracnosis en hoja y fruto de mango causado por *C. gloeosporioides*. **K)** antracnosis en hoja de maíz causado por *C. graminicola*. **L)** antracnosis en fruto de judía causado por *C. lindemuthianum*. Imagen tomada de (Cannon *et al.*, 2012).

Por todo ello y según la percepción de los fitopatólogos, este género se ha clasificado como uno de los diez patógenos fúngicos más importantes a nivel mundial en cuanto a las pérdidas económicas que provoca en el rendimiento de los cultivos (Dean *et al.*, 2012). A pesar de que muchas especies del género *Colletotrichum* son perjudiciales para los cultivos agrícolas, existen muchas otras que se clasifican como endofíticas o simbiotes ya que establecen relaciones mutualistas con su hospedador (Hyde *et al.*, 2009; Crouch *et al.*, 2009; Gazis *et al.*, 2011). En los bosques, el hongo endofítico más comunmente aislado de hojas asintomáticas son especies de *Colletotrichum*, principalmente del complejo agregado gloeosporioides (Cannon & Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2003).

Estilo de vida y modelos de infección de *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* posee una amplia variedad de hospedadores y en consecuencia diferentes estilos de vida, ya que puede ser patógeno asociado a plantas pero también comportarse como endófito, saprófito o incluso patógeno colonizador de insectos y humanos (Crouch *et al.*, 2014). Las especies de *Colletotrichum* asociadas a plantas comienzan su infección a partir de una espora que desarrolla una estructura de penetración especializada denominada apresorio (Wharton *et al.*, 2001; Kubo & Takano, 2013), al igual que muchas otras especies de hongos. Esta estructura globosa se melaniza y permite atravesar el tejido cuticular del hospedador gracias a la enorme presión de turgencia (unos 17 μ N) que ejerce sobre el mismo (Bechinger *et al.*, 1999). Debido a que contiene poliribosomas, mitocondrias y cuerpos lipídicos es capaz de secretar pectinasas y otras enzimas degradadoras de la pared celular de plantas que facilitan ese ablandamiento y penetración para favorecer la entrada y posterior infección (Skoropad, 1967; Wharton *et al.*, 2001; Mims & Vaillancourt, 2002; Kleemann *et al.*, 2008). Una vez dentro del hospedador, la infección progresa siguiendo distintas estrategias de colonización según la especie. Algunas especies, entre las que se encuentran muchos de los miembros de *C. gloeosporioides*, *C. capsici* o *C. acutatum* causantes de enfermedades postcosecha en frutas, se desarrollan siguiendo una necrotrofia subcuticular (Prusky, 1996; Liao *et al.*, 2012). Así, en primera instancia estos hongos permanecen infectando su hospedador de forma latente sin desarrollar síntomas, para después comenzar a liberar una gran diversidad de enzimas hidrolíticas que destruyen las células de la planta.

Sin embargo, la mayor parte de las especies de *Colletotrichum* desarrollan una estrategia de infección denominada hemibiotrofia intracelular. Durante la infección el hongo desarrolla hifas primarias o biotróficas, que se caracterizan por ser unas hifas gruesas y de corta longitud, de aspecto bulboso. Estas hifas colonizan las células vivas de la planta sin causar ningún tipo de síntoma o daño (Perfect *et al.*, 1999; Mims & Vaillancourt, 2002; O'Connell *et al.*, 2012) y además evaden la respuesta inmune de la planta que permanece activa desde el comienzo de la infección (Vargas *et al.*, 2012; Balmer *et al.*, 2013). Una vez que la colonización avanza en el tejido del huésped, se produce un cambio y las hifas primarias dejan paso a hifas secundarias o necrotróficas.

El momento de esta transición es variable en el tiempo ya que puede suceder desde pocas horas a varios días después de la infección según el tipo de especie (Perfect *et al.*, 1999; Perfect & Green, 2001; Münch *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2012). Las hifas necrotróficas se caracterizan morfológicamente por ser mucho más estrechas y alargadas que las hifas biotróficas, además de secretar gran cantidad de enzimas líticas que colapsan las células del huésped produciendo síntomas necróticos visibles (Perfect *et al.*, 1999; Münch *et al.*, 2008; Kleemann *et al.*, 2012).

Existen tres variantes de hemibiotrofia intracelular dependiendo de las especies. La primera estrategia de hemibiotrofia se basa en *Colletotrichum higginsianum* y otras especies del clado destructivum, las cuales muestran una biotrofia limitada a las primeras células epidérmicas de la planta y posteriormente cambian a un estilo de vida necrotrófico, matando el resto de células a medida que la infección avanza por los tejidos vegetales (Latunde-Dada & Lucas, 2007; O'Connell *et al.*, 2012).

La segunda estrategia de hemibiotrofia intracelular se basa en los miembros del agregado orbiculare, en los cuales la biotrofia se mantiene a medida que va colonizando secuencialmente nuevas células, pero de forma asintomática (Perfect *et al.*, 1999; Perfect & Green, 2001). En un punto determinado de la infección, las hifas biotróficas cambian a hifas necrotróficas manteniéndose de forma continuada la necrotrófia y apareciendo los síntomas visibles de la enfermedad.

La tercera estrategia de hemibiotrofia se desprende del modo de infección de las especies del complejo graminicola. El origen de la hemibiotrofia es similar al que se observa en el complejo orbiculare, pero las hifas necrotróficas aparecen como ramas secundarias de las hifas biotróficas. Una vez que las hifas necrotróficas se desarrollan, aparecen los síntomas de la infección. Sin embargo, el hongo continúa colonizando nuevas células en los bordes de la infección mediante hifas biotróficas. De esta forma, biotrofia y necrotrófia se mantienen de forma simultánea en la misma colonia (Wharton *et al.*, 2001; Mims & Vaillancourt, 2002). En la **Figura 3** se presenta un esquema con las diferentes estrategias de infección hemibiotróficas que poseen las especies del género *Colletotrichum*.

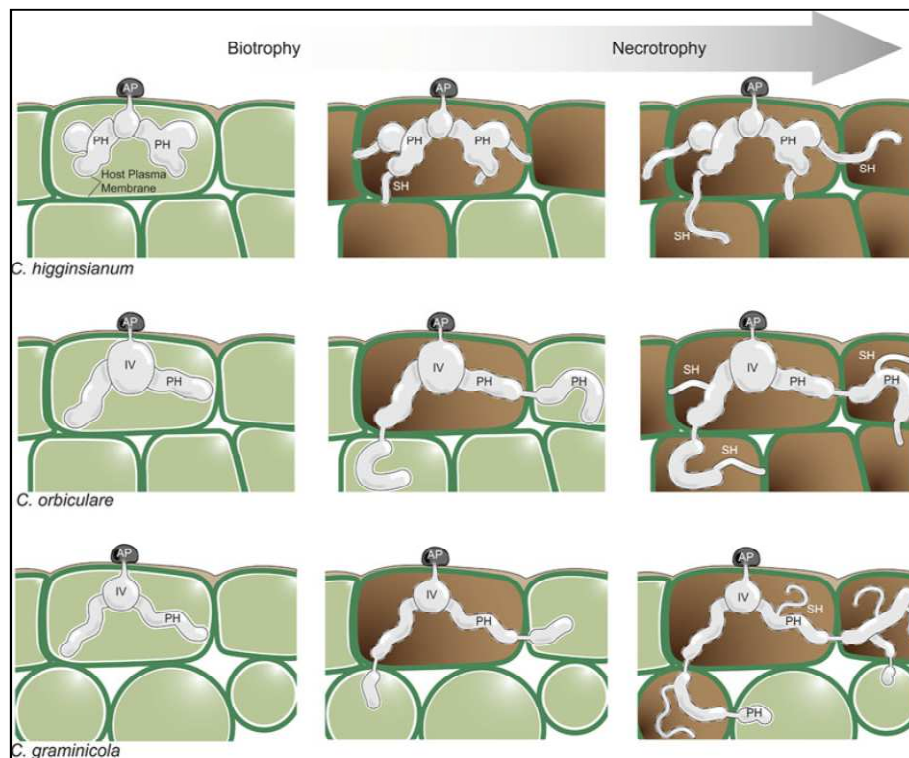


Figura 3: Variantes de hemibiotrofia intracelular que presentan las especies de *Colletotrichum*. AP= apresorio, PH= hifa primaria, SH= hifa secundaria, IV=vesícula de infección. (Tomado de (Crouch *et al.*, 2014)).

El género *Colletotrichum* se considera hoy en día como el modelo de estudio para comprender el proceso de la hemibiotrofia en los organismos fúngicos. Algunas de las investigaciones más tempranas sobre la interacción entre hospedador y patógeno y

sobre elicitores fúngicos de patogenicidad se llevaron a cabo utilizando los patosistemas de *Colletotrichum* (Lawton & Lamb, 1987; Wijesundera *et al.*, 1989; Dixon & Lamb, 1990). También ha adquirido una gran importancia en estudios experimentales que abarcan diversos aspectos de la fitopatología, incluyendo desarrollo fúngico, procesos de infección, resistencia del hospedador y biología molecular de la interacción planta-patógeno (Thon *et al.*, 2002; Sukno *et al.*, 2008b; Vargas *et al.*, 2012, 2016; Alkan *et al.*, 2015; Baroncelli *et al.*, 2015). Se considera uno de los hongos filamentosos patógenos de plantas más estudiados en la actualidad, ya que existen docenas de laboratorios distribuidos alrededor del mundo dedicados a investigar la biología y patología de varias especies de *Colletotrichum*.

***Colletotrichum graminicola*: el agente causal de la antracnosis del maíz**

Colletotrichum graminicola (Ces.) G.W. Wils. es el patógeno causante de la antracnosis en el maíz (*Zea mays*) (LeBeau, 1950; Jamil & Nicholson, 1991; Bergstrom & Nicholson, 1999). Tiene un gran potencial para dañar ecosistemas agrícolas y se estima que provoca anualmente pérdidas económicas por valor de más de mil millones de dólares únicamente en Estados Unidos (Frey *et al.*, 2011; Kamenidou *et al.*, 2013; Rech *et al.*, 2014). Su incidencia como amenaza global se prevee que aumente aún más debido al posible cambio climático y a la reducción en las prácticas agrícolas del rastrillaje de los rastrojos (Munkvold, 2002; Frey *et al.*, 2011). A su vez, el maíz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial con un área de siembra estimada de más de 184 millones de hectáreas (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>). En la actualidad es el cereal más cultivado globalmente seguido del trigo y el arroz (Pechanova *et al.*, 2013), lo que hace que su importancia agroeconómica adquiera una gran dimensión. No sólo sirve como alimento para humanos y animales, sino que es ampliamente utilizado en la industria para la producción de adhesivos, textiles o combustibles. Además, ha servido como organismo modelo para comprender la biología de las plantas monocotiledóneas y actualmente se considera uno de los sistemas genéticos más estudiados (Strable & Scanlon, 2009). En España, la comunidad autónoma de Castilla y León es la región que más hectáreas de maíz cultiva, dedicando

aproximadamente un 30% de su superficie cultivable (Subdirección General de Análisis, Prospectiva y Coordinación 2015). En Europa se ha detectado la presencia de *C. graminicola* en campos de maíz de países como Francia (Messiaen *et al.*, 1960), Croacia (Palaversic *et al.*, 2009), Suiza (Sukno *et al.*, 2014), Alemania (Böning & Wallner, 1936) y Portugal (Sanz-Martín *et al.*, 2016b). Recientemente se ha descrito en la literatura pérdidas significativas en las cosechas de maíz debidas a la antracnosis en Croacia (Palaversic *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito oficialmente que este patógeno se haya aislado de plantas con síntomas de antracnosis en España, aunque recientemente se ha detectado su presencia en la región de Lérida (Pioneer Hi-Bred, España, comunicación personal).

C. graminicola se ha establecido como sistema modelo para entender la biología y epidemiología del grupo de los graminícolas dentro del género *Colletotrichum*. Los teleomorfos son muy raros y aún no se han encontrado en el campo, sin embargo sí es posible cruzarlo sexualmente en condiciones de laboratorio (Vaillancourt & Hanau, 1991). Es cultivado *in vitro* de forma sencilla y los experimentos como disrupciones génicas, complementaciones y ensayos de patogenicidad son relativamente fáciles de llevar a cabo. *C. graminicola* también ha sido la primera especie de *Colletotrichum* en tener su genoma completamente secuenciado. La cepa M1.001 fue secuenciada en el año 2006 gracias a un proyecto financiado por la USDA junto con la National Science Foundation Microbial Genome Sequencing Project National Research Initiative de Estados Unidos. Se obtuvo un genoma de un tamaño de 57,4 Mb que se dividía en 13 cromosomas, incluyendo 3 mini cromosomas de menos de 1 Mb y se identificaron un total de 12.006 genes mediante anotación. Estos resultados fueron publicados posteriormente junto con la secuenciación y anotación del genoma de *C. higginsianum* en el año 2012 (O'Connell *et al.*, 2012) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group/MultiHome.html). La secuenciación del genoma ha permitido la identificación de interesantes candidatos para llevar a cabo aproximaciones genéticas reversas y así ofrecer información sobre el transcriptoma o secretoma de esta especie (O'Connell *et al.*, 2012; Rech *et al.*, 2014; Schliebner *et al.*, 2014; Sanz-Martín *et al.*, 2016a; Vargas *et al.*, 2016).

Ciclo de vida y sintomatología de *C. graminicola*

A continuación, se describe el ciclo de vida de *C. graminicola* basado en revisiones que han sido publicadas con anterioridad (Perfect *et al.*, 1999; Bergstrom & Nicholson, 1999; Latunde-Dada, 2001; Crouch & Beirn, 2009). Este ciclo de vida se caracteriza por cinco fases temporales bien diferenciadas:

- Hibernación y fuentes de inóculo primario

C. graminicola puede pasar el invierno en el suelo entre residuos vegetales en descomposición en forma de micelio, acérvulos, hipopodios melanizados, esclerocios y microesclerocios (Bergstrom & Nicholson, 1999). Su supervivencia depende de las condiciones climatológicas y la microbiota del entorno. Así, cuando las condiciones son adecuadas el material fúngico puede pasar el invierno con eficacia proporcionando una fuente de inóculo primario para la siguiente temporada (Lipps, 1983, 1988).

- Diseminación

La transmisión de una planta a otra se da a través de conidios asexuales de forma falcada, y este proceso depende principalmente de las salpicaduras de las gotas de lluvia y las ráfagas de viento (Bergstrom & Nicholson, 1999). Los acérvulos se forman a partir de tejido vegetal necrótico produciendo numerosos conidios falcados que sirven también como fuente de inóculo secundario.

- Unión y penetración en el hospedador

Gracias a que los conidios poseen una matriz extracelular compuesta por manosa y glicoproteínas, se adhieren a la superficie rígida e hidrofóbica del huésped y comienzan a germinar. Poco después se forma el tubo germinativo que desarrolla el apresorio necesario para la penetración, aunque *C. graminicola* también puede colonizar y penetrar en la planta a través de heridas preformadas en el tallo (Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007). Después de la penetración en la planta huésped, el hongo pasa a través de un corto período de biotrofia comprendido entre las 36-72 horas post infección (hpi), dependiendo del genotipo del huésped y el tejido infectado (Mims & Vaillancourt, 2002; Horbach *et al.*, 2011). En el caso de la línea de

maíz Mo940 y el aislado *C. graminicola* M1.001, nuestro grupo de investigación ha caracterizado el periodo biotrófico entre 36-60 hpi (Vargas *et al.*, 2012). Durante esta etapa las hifas comienzan a crecer en el espacio formado entre las paredes celulares y las membranas plasmáticas de la célula huésped (Politis & Wheeler, 1973; Mims & Vaillancourt, 2002). Las células de la planta invadidas por el hongo empiezan a degradarse y las hifas primarias comienzan a expandirse y penetrar en las células cercanas. Al cabo de unas 72 hpi se produce la fase de infección necrotrófica (Vargas *et al.*, 2012).

- Colonización sistémica de hojas y tallo

El inóculo secundario comienza a desarrollarse en las hojas y los conidios pasan de hoja a hoja por las salpicaduras de lluvia, haciéndolas más susceptibles a la infección. La antracnosis puede afectar a toda la planta, pero los síntomas son especialmente visibles en las hojas en forma de manchas necróticas. En el caso del tallo, la infección comienza cuando los conidios formados en las hojas son desplazados por las salpicaduras de lluvia detrás de la vaina de la hoja, hacia la corteza del tallo. Además, la infección en el tallo también puede iniciarse por la entrada del patógeno a través de heridas en la corteza provocadas por insectos o condiciones ambientales (Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007). Una vez en el interior del tallo, se comporta como un patógeno vascular. Principalmente infecta plantas que se encuentran al final de su ciclo vegetativo o en etapas de desarrollo reproductivo tempranas. En condiciones favorables, la colonización vascular sistémica acaba en un marchitamiento conocido como " muerte regresiva superior" en el que las hojas superiores son infectadas durante el comienzo de la formación del grano. Sin embargo, la colonización vascular habitual no muestra síntomas en los tallos hasta la senescencia de la planta. También se ha descrito que es capaz de infectar de forma asintomática las raíces para después colonizar sistémicamente los tejidos de las partes aéreas, desarrollando la infección de una forma distinta a como ocurre el proceso de antracnosis en las hojas (Sukno *et al.*, 2008b). En la **Figura 4** se muestran los síntomas típicos de antracnosis producidos por *C. graminicola* en distintas partes del maíz.

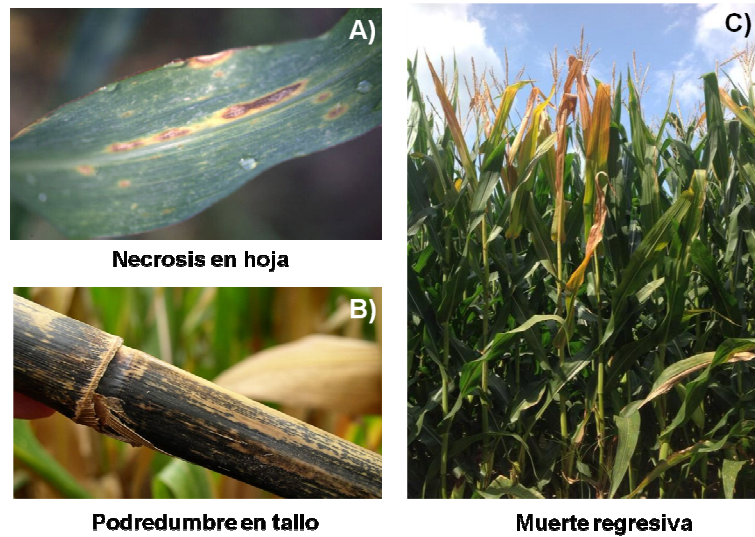


Figura 4: *C. graminicola* produce antracnosis en el maíz. *C. graminicola* infecta todas las partes aéreas de la planta del maíz causando síntomas característicos de antracnosis. **A)** Necrosis en hojas. **B)** Podredumbre en el tallo. **C)** Muerte regresiva en la parte superior de la planta. Imágenes tomadas de Pioneer® (<https://www.pioneer.com>).

- Crecimiento saprofito

El hongo sobrevive como saprófito sobre residuos de maíz infectados que se encuentran en la superficie del suelo. En la **Figura 5** se representa el ciclo de vida y de infección de *C. graminicola*.

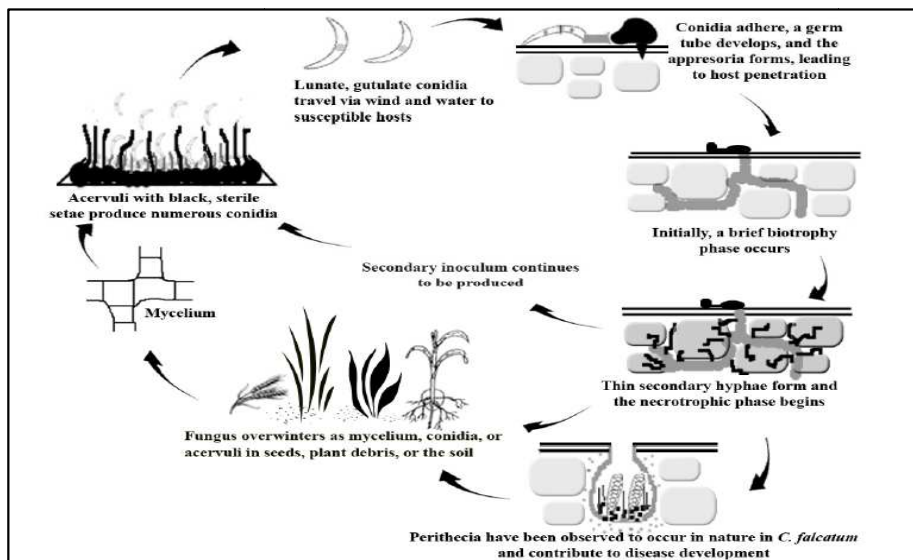


Figura 5: Ciclo de vida de *C. graminicola*. Imagen tomada de (Crouch & Beirn, 2009).

El sistema inmune de las plantas

Las plantas están expuestas a una gran variedad de hongos, bacterias, virus, oomicetos, insectos y nematodos fitopatogénicos. Para hacer frente a estas amenazas potenciales han desarrollado un sistema inmunitario altamente eficiente. El sistema inmune de las plantas muestra sorprendentes similitudes, pero también grandes diferencias con el sistema inmune de los vertebrados. A diferencia de éstos, que poseen un sistema inmune innato para defensa temprana y un sistema inmune adaptativo para la defensa de fase tardía y la memoria inmunológica, las plantas dependen totalmente de un sistema inmune innato (Nürnberg *et al.*, 2004; Akira *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Este sistema inmune comprende una serie de mecanismos tanto preformados como inducibles. La línea primaria de defensa la conforman un conjunto de barreras físicas estáticas como ceras, cutículas y paredes celulares de la epidermis que además protegen a la planta frente a la deshidratación y otros estreses ambientales (Dangl & Jones, 2001; Koeck *et al.*, 2011). Estas defensas son capaces de prevenir algunas enfermedades, pero no son suficientes para proteger a la planta totalmente ya que muchos patógenos son capaces de atravesarlas.

La primera respuesta de defensa: reconocimiento de patrones microbianos y respuesta PTI

El contacto con moléculas o estructuras altamente conservadas presentes en las células microbianas permite activar el primer nivel de defensas inducibles. Estas moléculas elicitoras tienen un papel esencial en el correcto funcionamiento del organismo microbiano y se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), en caso de que no pertenezcan a microorganismos patógenos (Jones & Dangl, 2006; Newman *et al.*, 2013). Incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos y algunas pequeñas moléculas como el ATP. Los ejemplos más estudiados de M/PAMPs bacterianos son el péptido flg22 derivado de la flagelina y los péptidos elf18 y elf26 del factor de elongación (EF-Tu) (Felix *et al.*, 1993; Zipfel, 2009; Trdá *et al.*, 2014). Otros muchos M/PAMPs bacterianos han sido identificados como por ejemplo los peptidoglicanos

(Kunze *et al.*, 2004; Willmann *et al.*, 2011; Gust, 2015), los lipopolisacáridos (Newman *et al.*, 2002; Erbs & Newman, 2012) y las proteínas de choque frío (Felix & Boller, 2003). En el caso de los hongos y oomicetos, los M/PAMPs más estudiados han sido los oligómeros de quitina (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007), los ácidos eicosapolienoicos (Savchenko *et al.*, 2010), los β -glucanos (Klarzynski *et al.*, 2000), los ramnolípidos (Sanchez *et al.*, 2012), la xilanasa (Ron & Avni, 2004) y la proteína Ave1 (de Jonge *et al.*, 2012). También se clasifican como M/PAMPs las proteínas inductoras de necrosis (NLPs) y los cerebrósidos A y C (Boller & Felix, 2009; Postel & Kemmerling, 2009). Además, las plantas también responden a pequeños compuestos endógenos que son liberados a partir de moléculas o estructuras más grandes por la acción de enzimas producidas durante la invasión del patógeno, como los monómeros de cutina, oligogalacturónidos, sisteminas y celodextrinas procedentes de la pared celular. Todos ellos se denominan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Boller & Felix, 2009; Galletti *et al.*, 2009; Brutus *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2013; Serrano *et al.*, 2014). Recientemente, también se ha descubierto que los péptidos endógenos de la planta AtPeps se comportan como potentes DAMPs (Yamaguchi & Huffaker, 2011).

La detección de los M/PAMPs por proteínas receptoras de superficie conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) desencadena en la planta un conjunto de defensas basales denominadas inmunidad provocada por PAMPs (PTI) (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010; Zeilinger *et al.*, 2015). Esta PTI engloba una amplia variedad de respuestas, desde nivel celular a organismo, destinadas a obstaculizar la replicación de los patógenos y la progresión de la enfermedad. Así, las respuestas PTI celulares tempranas incluyen el cierre de los estomas, el rápido flujo y movilización de iones calcio a partir de las reservas externas, la producción y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), la activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), la expresión de genes relacionados con la inmunidad y la deposición de calosa en los sitios de infección para reforzar la pared celular formando estructuras denominadas papilas (Nürnberg *et al.*, 2004; Boller & Felix, 2009; Scheler *et al.*, 2013). Las ROS y RNS pueden actuar también en la señalización y tienen un efecto antimicrobiano directo. Además, las ROS están implicadas en el reforzamiento de la pared celular debido a que favorecen la

oxidación y el entrecruzamiento de los polímeros que la componen (Torres *et al.*, 2006).

En la mayor parte de los casos la PTI es suficiente para detener el crecimiento microbiano, y la mejor demostración de su relevancia biológica es la necesidad que tienen los patógenos adaptados de evadir o suprimir esta primera respuesta inmunitaria con el fin de causar la enfermedad (Dodds & Rathjen, 2010; Dou & Zhou, 2012; Macho & Zipfel, 2014). Además, también se ha observado que las plantas defectuosas en PRRs o componentes de la señalización de la PTI son a menudo más susceptibles a patógenos adaptados y no adaptados (Zhang *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011).

Como se ha dicho, los receptores PRR de las plantas son proteínas transmembrana altamente conservadas y pueden ser agrupadas en dos tipos: receptores tipo quinasa (RLKs) o receptores tipo proteínas (RLPs). Los RLKs se componen de un ectodominio para la unión del ligando, un dominio transmembrana y un dominio quinasa intracelular. Por su parte, los RLPs poseen una estructura similar a los RLKs pero sin dominio quinasa (Macho & Zipfel, 2014). El ectodominio puede contener repeticiones ricas en leucinas (LRRs), motivos lisina (LysMs) o dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se activan constituyendo homodímeros o heterodímeros en función del tipo de ligando y de la especie de planta (Zipfel, 2009, 2014). Los PRRs que contienen el dominio LRR unen proteínas o péptidos como la flagelina bacteriana o los péptidos endógenos Pep, mientras que los PRRs que contienen otros dominios están relacionados con el reconocimiento de moléculas con carbohidratos como la quitina fúngica, los peptidoglicanos bacterianos y el ATP extracelular (Wu & Zhou, 2013). Con respecto a la quitina, se han descrito dos receptores capaces de reconocer esta molécula, CEBiP y CERK1. La proteína transmembrana CEBiP descubierta en el arroz une quitina extracelular y requiere el correceptor OsCERK1 para la posterior señalización (Kaku *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2010). El receptor CERK1 (Chitin elicitor receptor kinase 1) fue descubierto en *Arabidopsis thaliana* y está relacionado con la percepción de la quitina y la señalización mediada por actividad serín/treonín quinasa intracelular (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que CERK1 también une quitina y quitina desacetilada de forma directa y parece ser la

principal proteína de unión a quitina de *A. thaliana* (Petutschnig *et al.*, 2010). Para dar una idea de la complejidad de PRRs que existen, en la **Figura 6** se muestran algunos de los receptores PRR más representativos descritos en las plantas y sus ligandos.

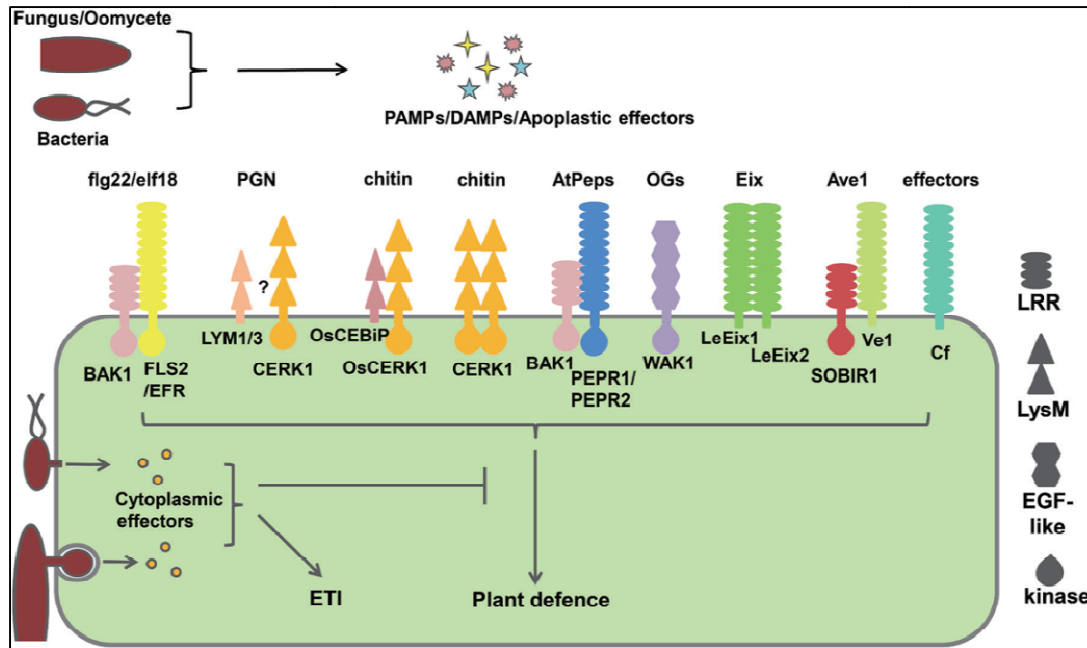


Figura 6: PRRs representativos y sus ligandos. En esta imagen se muestra la diversidad de receptores de superficie que poseen las plantas y sus posibles combinaciones para adquirir funcionalidad. Imagen tomada de (Wu & Zhou, 2013).

Segunda respuesta de defensa. Respuesta ETI

De forma genérica, una vez que los patógenos detectan la respuesta primaria de defensa PTI comienzan a sintetizar factores de virulencia (efectores) para intentar suprimirla, causando en la planta un estado de susceptibilidad provocada por efectores (ETS). Por su parte, la planta desarrolla una segunda etapa de defensa conocida como inmunidad provocada por efectores (ETI), la cual está basada en el reconocimiento específico de proteínas efectoras que han sido secretadas por el patógeno (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Los primeros estudios en los que se demostró que las proteínas efectoras controlaban funciones celulares del huésped como la expresión génica y el tráfico de vesículas, se realizaron con bacterias patógenas de plantas. Un ejemplo es la proteína HopM1 de *Pseudomonas syringae*; este efector se une a la proteína del huésped AtMIN7 para su degradación mediante proteosoma (Nomura *et*

al., 2006). AtMIN7 es un factor intercambiador de GTPasas (GEF) muy importante para la formación de vesículas y el tráfico intracelular, sugiriendo así que los patógenos bacterianos modulan el tráfico vesicular para interferir con las respuestas inmunitarias localizadas del hospedador. De forma similar, XopJ de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* suprime la deposición de calosa afectando a la secreción de proteínas (Bartetzko *et al.*, 2009). Estos dos ejemplos muestran que la interacción con las vías de secreción es una estrategia común de los patógenos de plantas. En el caso de patógenos fúngicos, también se ha comprobado que causan modificaciones transcripcionales en su hospedador, modulando la expresión de genes de defensa y reprogramando metabólicamente los tejidos colonizados durante fases específicas de la infección (O'Connell *et al.*, 2012; Doehlemann *et al.*, 2014).

La respuesta ETI desencadena mecanismos de defensa más rápidos y fuertes que la respuesta PTI, como por ejemplo la respuesta hipersensible (HR) (Jones & Dangl, 2006). Esta respuesta HR incluye la producción de ROS y la muerte celular programada (PCD) en el lugar de la infección, evitando que el patógeno se extienda (Spoel & Dong, 2012). Finalmente todo esto puede desencadenar en un estado de activación constitutivo de las defensas sistémicas conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Ross, 1961). La respuesta SAR, que puede durar desde semanas a meses, se caracteriza típicamente por producir una restricción en el crecimiento de los patógenos y suprimir el desarrollo de los síntomas de la enfermedad en partes de la planta no infectadas, haciéndolas más resistentes a un amplio espectro de patógenos incluyendo virus, bacterias y hongos (Kuč, 1982; Ryals *et al.*, 1996; Hammerschmidt, 1999). Durante la respuesta SAR de la planta también se liberan fitohormonas señalizadoras como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) o el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2001; Thomma *et al.*, 2001). Estas hormonas juegan un papel clave en la transducción de la señal y están asociadas a la activación posterior de distintos grupos de genes que codifican proteínas relacionadas con defensa de la planta (PR) (Reymond *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000; Maleck *et al.*, 2000). Clásicamente, el ácido salicílico se libera como respuesta señalizadora frente al ataque de patógenos biotróficos y hemibiotróficos mientras que la señalización dependiente del JA y ET es importante frente al daño mecánico y para combatir la invasión de patógenos

necrotróficos e insectos herbívoros (Pieterse *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005). Además, se ha observado que las vías de defensa del SA y el JA/ET son antagonistas y mutuamente inhibitorias en muchos casos (Kunkel & Brooks, 2002). Otras hormonas como las citoquininas, auxinas, ácido absísico y brasinoesteroides también son importantes para modular la señalización del sistema inmune (Pieterse *et al.*, 2012).

Durante la evolución, las plantas han diseñado mecanismos para detectar e interceptar la actividad de los efectores patogénicos mediante una nueva clase de proteínas receptoras. Estos receptores se componen de una proteína del tipo LRR que contiene dominios de unión a nucleótidos (NB) y pueden ser de dos tipos: receptores CC-NB-LRR (coiled coil) y receptores TIR-NB-LRR (Toll-interleukin-1) dependiendo del dominio que posean en su extremo N terminal (Chisholm *et al.*, 2006). Los receptores NB-LRR, que en su mayoría son citoplásmicos, vuelven a activar las defensas inducibles del huésped y confieren resistencia frente a diversos patógenos incluyendo hongos, oomicetos, bacterias, virus e insectos (Dodds & Rathjen, 2010). En este contexto, los efectores detectados se definen como proteínas de Avirulencia (Avr) y las proteínas receptoras de la planta que se asocian con ellas se conocen como proteínas de Resistencia (R) (Dodds & Rathjen, 2010), ajustándose al modelo de “resistencia gen a gen” que ya había sido descrito previamente (Flor, 1971). Así, la interacción con los efectores puede darse mediante asociación física directa o indirecta. Se ha observado interacción directa entre proteínas Avr y R más habitualmente en hongos que en bacterias. Por ejemplo, se da interacción directa en varios de los pares Avr-R de *Magnaphorte oryzae* y arroz (Liu *et al.*, 2013) y entre los más intensamente estudiados se encuentran Avr-Pita (Jia *et al.*, 2000), Avr-Pii (Yoshida *et al.*, 2009), Avr-Pik/km/kp (Kanzaki *et al.*, 2012), Avr1-Co39 y Avr-Pia (Ribot *et al.*, 2013; Cesari *et al.*, 2013). El reconocimiento indirecto entre proteínas Avr y R se conceptualiza en la “Hipótesis del Guardián”, en la que un efector se une a su molécula diana en la planta provocando una modificación en ella. Esta modificación activa a un receptor NB-LRR que promueve la defensa ETI (Dangl & Jones, 2001). Un ejemplo de esta interacción sucede con la proteína RIN4 (RPM1-interacting protein 4) de *A. thaliana*, que actúa como un regulador negativo de la respuesta ETI (Kim *et al.*, 2005). Las proteínas efectoras AvrRpm1, AvrB, AvrRpt2 y HoPF2 de *Pseudomonas syringae* modifican a RIN4 a través

de diferentes estrategias moleculares (Mackey *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Wilton *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011) y estos cambios activan a las proteínas NB-LRR RPM1 y RPS2 que desencadenan la respuesta ETI.

Aunque de forma simplificada, la visión general de la evolución de las respuestas de defensa inducibles en las interacciones planta-patógeno que se ha explicado anteriormente está resumida en el “modelo zig-zag” (Jones & Dangl, 2006) que se ilustra en la **Figura 7**. De acuerdo con este modelo, la respuesta PTI es desencadenada por un amplio rango de patógenos microbianos puesto que los M/PAMPs permanecen conservados en todos los microorganismos, mientras que la respuesta ETI es típicamente específica de cepas patogénicas, siendo más rápida, fuerte y prolongada que la ETI (Jones & Dangl, 2006). Sin embargo, esta estricta diferencia entre respuesta PTI y ETI ha sido recientemente puesta en entredicho por algunos autores, ya que se ha observado que algunos M/PAMPs elicitan HR y algunos efectores desencadenan respuestas ETI muy débiles (Thomma *et al.*, 2011). Además, los patrones de expresión génica causados por PTI y ETI son muy similares entre sí, lo que sugiere que las respuestas son las mismas pero varían en magnitud (Tao *et al.*, 2003), llevando a pensar que es quizás más importante el periodo de exposición y la dosis percibida de moléculas patógenas que su propia naturaleza (Thomma *et al.*, 2011).

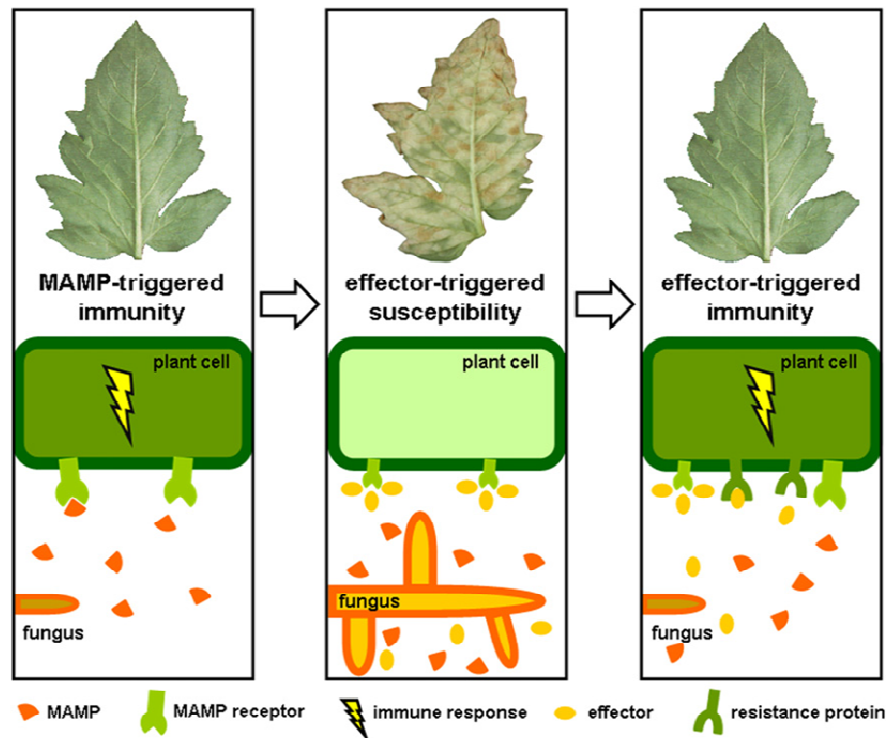


Figura 7: Modelo evolutivo de respuesta inmunitaria causada por la interacción entre la planta y el patógeno. Inicialmente, la percepción de M/PAMPs por receptores de superficie PRR de la planta desencadena la respuesta M/PTI (panel izquierdo). Los patógenos evolucionan para secretar proteínas efectoras que alteran la inmunidad M/PTI, provocando un estado de susceptibilidad en el huésped (panel central). A su vez, la evolución impulsa a las plantas a desarrollar proteínas de resistencia que reconocen estos efectores y activan nuevas defensas en la planta (panel derecho). Imagen tomada de (Kombrink *et al.*, 2011).

Efectores. Proteínas que manipulan el sistema de defensa del hospedador

Los efectores se han convertido en una clase de moléculas muy importante para entender el conjunto de las interacciones planta-microorganismo. La comprensión de sus funciones moleculares es esencial para entender los procesos de infección por parte de los organismos invasores. Como definición general ampliamente aceptada, se considera efector a aquellas proteínas y pequeñas moléculas derivadas de patógenos que alteran la estructura y función celular del huésped (Hogenhout *et al.*, 2009). Así, los efectores pueden actuar de múltiples maneras facilitando la colonización e infección, suprimiendo la respuesta de defensa de la planta, alterando el balance de nutrientes y energía de la planta, etc. (Macho, 2016). Según su lugar de acción las

proteínas efectoras de los hongos filamentosos patógenos pueden dividirse en efectores apoplásticos y efectores citoplasmáticos.

Efectores localizados en el apoplasto de la planta

El apoplasto de la planta es el lugar donde se lleva a cabo la interacción inicial de compatibilidad entre planta y microorganismo y, en comparación con el citoplasma, los mecanismos moleculares de interacción que suceden en este compartimento están mucho menos estudiados (Du *et al.*, 2016). El apoplasto comprende espacios intercelulares, paredes celulares del hospedador y los espacios que se forman entre el citoplasma del hospedador y estructuras especializadas de infección del patógeno. En él circulan los fluidos apoplásticos y tienen lugar procesos como desarrollo vegetativo, comunicaciones intercelulares y mecanismos de defensa. Los fluidos apoplásticos están compuestos de diversas sustancias como nutrientes, polisacáridos, metabolitos secundarios y proteínas secretadas. Estas proteínas se encargan de diferentes procesos biológicos y fisiológicos relacionados con el mantenimiento de la pared celular, la regulación del crecimiento y estreses bióticos y abióticos (Delaunoy *et al.*, 2014). Como se ha descrito anteriormente, cualquier patógeno necesita eludir la activación de las defensas apoplásticas de la planta. En primer lugar necesita defenderse de las enzimas de degradación o moléculas tóxicas como el H₂O₂, y posteriormente necesita evitar la producción de señales que darían lugar a una inducción o incluso una amplificación de las respuestas de defensa de la planta. Para combatir las defensas apoplásticas del hospedador los patógenos secretan un arsenal de proteínas efectoras con diferentes funciones: 1) ocultan al patógeno para evitar ser reconocido, 2) detoxifican los compuestos antimicrobianos que produce el hospedador o 3) inhiben estos compuestos antimicrobianos (Ökmen & Doehlemann, 2014).

1) Una vez que los M/PAMPs fúngicos son reconocidos por PRRs afines se induce la expresión de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs) cuya actividad amplificará aún más la respuesta de defensa. Por ello, uno de los desafíos a los que se enfrentan los patógenos fúngicos es enmascarar la quitina de la que se compone

principalmente su pared celular. Esta acción pueden llevarla a cabo empleando diversos mecanismos.

La quitina puede desacetilarse en quitosán mediante las enzimas desacetilasas de quitina y de esta forma se reduce la liberación al medio de M/PAMPs y se protege a la pared celular contra el ataque de las quitinasas. Esta molécula se ha detectado en la superficie de las paredes celulares de las estructuras de infección de varios patógenos fúngicos como *Puccinia graminis f. sp. tritici*, *C. graminicola* o *Uromyces fabae* (Vander *et al.*, 1998; El Gueddari *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2007). Un estudio de análisis transcriptómico RNA-seq del patógeno del cacao *Moniliophthora perniciosa* indicó que al menos cuatro desacetilasas de quitina se encontraban sobreexpresadas durante el desarrollo biotrófico del hongo, promoviendo de esta forma su virulencia (Teixeira *et al.*, 2014). Otros hongos como *M. oryzae* también pueden enmascarar sus moléculas de β -glucanos y convertirlos en α -glucanos, de tal forma que no puedan ser detectados por la planta y así evitan la respuesta PTI (Fujikawa *et al.*, 2012). Además, estos α -1,3 glucanos tienen un papel protector para el hongo frente a enzimas líticas como las quitinasas. De hecho, mutantes de *M. oryzae* delecionados en el gen de la α -1,3 glucano sintasa (AGS1) se comportan como no patógenos en arroz (Fujikawa *et al.*, 2012). Se ha observado que este mecanismo está conservado en otras especies como *Cochliobolus miyabeanus* y *Rhizoctonia solani* y se han identificado ortólogos putativos de AGS1 en otros patógenos fúngicos con genomas secuenciados como *P. graminis*, *Zimoseptoria tritici* y *C. graminicola*, lo que indica que esta estrategia es común entre patógenos (Fujikawa *et al.*, 2012). *Colletotrichum lindemuthianum* posee la glicoproteína CIH1 que forma una estructura multimérica en el espacio intermembrana formado por la hifa biotrófica y la membrana plasmática de la planta. De esta forma el hongo evita el contacto directo entre la pared celular de las hifas y la membrana plasmática de la planta y además con ella mimetiza las glicoproteínas de la planta para no ser reconocido (Perfect *et al.*, 1998; Takahara *et al.*, 2009).

Debido a que las plantas son capaces de sintetizar quitinasas, pueden hidrolizar las paredes celulares fúngicas destruyendo al patógeno (Kasprzewska, 2003). Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace β -1,4 glicosídico que se encuentra en las moléculas de quitina y de quitosán. Están implicadas en numerosos

procesos fisiológicos de la planta como por ejemplo respuestas bióticas y abióticas, embriogénesis, asociaciones simbióticas y crecimiento (Kasprzewska, 2003). Además también se clasifican habitualmente como proteínas de defensa PR, ya que su expresión se induce como respuesta a la invasión de diversos tipos de patógenos (Kasprzewska, 2003; van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008; Shores & Harman, 2010). Dependiendo de su dominio catalítico pueden clasificarse en dos familias: GH18 y GH19 (Udaya Prakash *et al.*, 2010). La familia glicosil hidrolasa 18 incluye las quitinasas de la clase III y V, mientras que la familia GH19 incluye las clases I, II y IV (Henrissat & Bairoch, 1993). Las quitinasas de clase IV son un grupo derivado de las quitinasas de clase I y se localizan principalmente en el apoplasto (Collinge *et al.*, 1993). Están compuestas por un corto dominio N terminal unido a un dominio C terminal que posee la actividad quitinasa. La unión se da a través de una región conservada de unos 60 aminoácidos conocida como región bisagra (Ubhayasekera *et al.*, 2009; Chaudet *et al.*, 2014). Las quitinasas no sólo tienen actividad antifúngica directa como se ha descrito anteriormente, sino que la liberación de oligómeros de quitina al medio es detectada por los receptores PRR de la planta y desencadena la respuesta inmunitaria PTI. Para evitar que esto suceda, los hongos han desarrollado diversas estrategias de protección frente a las quitinasas. El patógeno *Cladosporium fulvum* secreta en el espacio extracelular de las hojas de tomate que ha colonizado, efectores como Avr4 y Ecp6 que poseen dominios de unión a quitina LysM. Avr4 es capaz de unirse a la quitina de las paredes celulares del hongo y evitar así que las quitinasas de la planta puedan acceder a ella (van den Burg *et al.*, 2006; van Esse *et al.*, 2007). Ecp6 posee 3 dominios LysM que unen oligómeros de quitina liberados por la acción de las quitinasas con mucha mayor afinidad que los receptores inmunes LysM de la planta. De esta manera no son detectados y se previene la activación de la respuesta PTI (de Jonge *et al.*, 2010; Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Se han identificado homólogos funcionales de Avr4 en especies de hongos de la clase Dothideomycetes como *Mycosphaerella fijiensis* y *Dothistroma septosporum* (Stergiopoulos *et al.*, 2010; Wit *et al.*, 2012; Mesarich *et al.*, 2016) y homólogos funcionales de Ecp6 en *M. oryzae* (Slp1) y *Zymoseptoria tritici* (Mg3LysM) (Marshall *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012). En todas estas especies de hongos, se ha demostrado que los efectores de unión a quitina son necesarios para la virulencia (**Figura 8**). Además de las quitinasas, las glucanasas de la planta también

pueden atacar al patógeno y son por ello diana de efectores fúngicos. Se ha demostrado en *C. graminicola* que la síntesis de β -1,3 glucanos es esencial durante la formación de apresorios y la etapa necrotrófica de la infección, pero se encuentra regulada negativamente en la etapa de desarrollo biotrófico (Oliveira-Garcia & Deising, 2013). Esta regulación permite evadir el reconocimiento y la posterior respuesta de defensa de la planta. En el caso del patógeno del maíz *Fusarium verticilloides*, la actividad de la β -1,3 glucanasa se ve modulada por una toxina fúngica secretada denominada fumonisina B1 (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

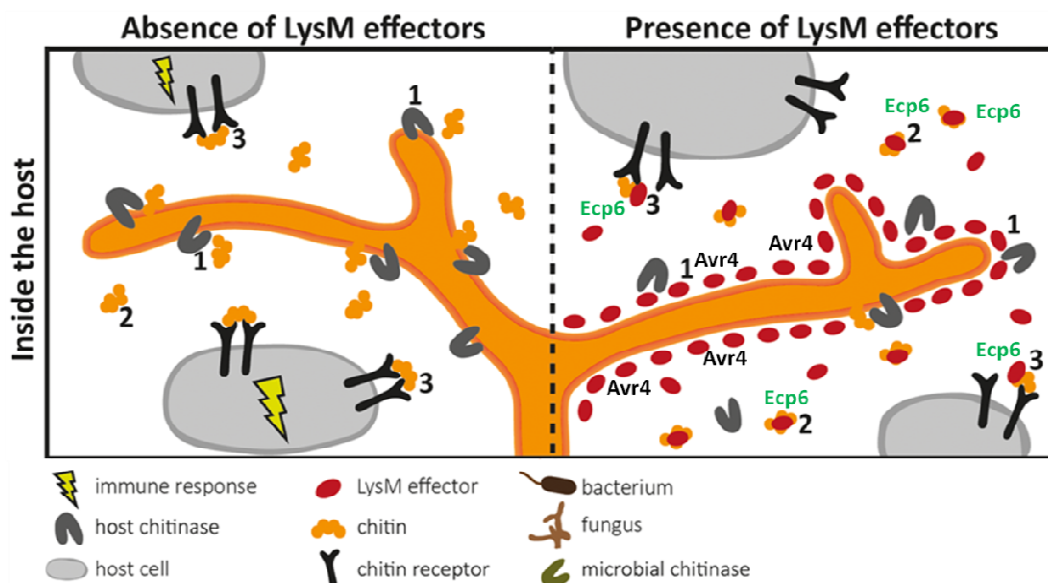


Figura 8: Esquema de los distintos efectores fúngicos que contienen dominios LysM y las funciones que desempeñan. 1) En primer lugar estos efectores pueden proteger a las hifas de los hongos frente a las enzimas hidrolíticas secretadas por el hospedador, como sucede con Avr4. **2)** En segundo lugar pueden secuestrar fragmentos de quitina derivados de la pared celular de los hongos de modo que no se estimule la respuesta inmune del hospedador, como sucede con Ecp6. **3)** En tercer lugar interfieren con la activación de los receptores LysM del hospedador ya que impiden que se produzca la dimerización inducida por ligando. Imagen modificada de (Kombrink & Thomma, 2013).

2) Los patógenos también detoxifican las moléculas inducidas por la respuesta de defensa de la planta, en especial la acumulación de ROS. Estas ROS causan la oxidación de péptidos y ácidos nucleicos de los patógenos y activan la respuesta HR y PCD de la planta, además de la producción de fitoalexinas (Mehdy, 1994; Torres *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2015). Para los patógenos es difícil bloquear la respuesta ROS ya que

las células de la planta producen estas moléculas a través de una gran variedad de enzimas, por lo que no se conocen muchos ejemplos de efectores fúngicos que alteren este mecanismo. Recientemente se ha identificado en *Ustilago maydis* la proteína apoplástica Pep1 (*Protein essential during penetration 1*), capaz de inhibir directamente la peroxidasa POX12 del maíz y de esta forma facilitar la infección. De hecho, los mutantes delecionados del gen Pep1 inducen una respuesta de defensa muy fuerte y son incapaces de penetrar en la planta (Hemetsberger *et al.*, 2012). También se ha descrito que el patógeno necrotrófico *Alternaria alternata* es capaz de detoxificar ROS producidas por la planta a través del control de la regulación de la adquisición de hierro mediada por sideróforos (Chen *et al.*, 2014).

3) Como se ha indicado anteriormente, las plantas secretan diversas enzimas hidrolíticas como respuesta frente a los patógenos microbianos. Estas enzimas hidrolíticas son principalmente proteasas que están implicadas en la percepción, señalización y activación de la respuesta de defensa basal frente al ataque de patógenos. Además, también pueden degradar los efectores secretados por el patógeno (Ökmen & Doehlemann, 2014). Las proteasas de la planta pueden tener una expresión constitutiva o inducible como por ejemplo las cisteín proteasas tipo papaína (PLCPs) o las serín y aspartato proteasas. Por todo ello, existe un gran grupo de efectores secretados que protegen al patógeno frente a la degradación mediada por proteasas de la planta. Algunos de los primeros inhibidores de proteasas descritos en fitopatógenos fueron las proteínas tipo kazal EPI1 y EPI10 del oomicete *Phytophthora infestans* que inhiben la actividad subtilisina serín proteasa de la proteína P69B del tomate (Tian *et al.*, 2004, 2005). Otras dianas de efectores son las cisteín proteasas PCLP de la planta. El efector Avr2 secretado durante la infección por *C. fulvum*, es necesario para la completa virulencia de este hongo en el tomate (Rooney, 2005). Avr2 inhibe las cisteín proteasas Pip1 y Rcr3 del tomate para favorecer el crecimiento del hongo en el apoplasto. Además, se ha observado que las plantas que expresaban Avr2 mostraron un aumento en la susceptibilidad a otros patógenos fúngicos como *Verticillium dahliae* o *Botrytis cinerea* (van Esse *et al.*, 2008). Otros dos efectores inhibidores de proteasas son las proteínas tipo cistatinas EPIC1 y EPIC2B de *P. infestans*, cuya expresión se induce altamente durante la fase biotrófica de la infección

en hojas de tomate. Estos inhibidores de proteasas inhiben las proteasas Rcr3, Pip1 y C14 presentes en el apoplasto del tomate y la patata (Tian *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010). Otro ejemplo de efector apoplástico inhibidor de cisteín proteasas es Pit2, el cual es secretado por *U. maydis*. Pit2 inhibe las cisteín proteasas del maíz CP2, CP1A y CP1B y también se ha observado que está implicado en la formación de tumores (Doehlemann *et al.*, 2011; Linde *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2013). La proteína Gr-VAP1 (*Venom Allergen-like Protein 1*) del nemátodo *Globodera rostochiensis* se une e inhibe la cisteín proteasa Rcr3 del tomate. Esta unión provoca un cambio conformacional en Rcr3 que es detectado por el receptor Cf2 de tomate y se activa la inducción de respuestas de defensa (Lozano-Torres *et al.*, 2012). En la **Figura 9** se presenta un esquema general de distintos efectores y su rol en la planta.

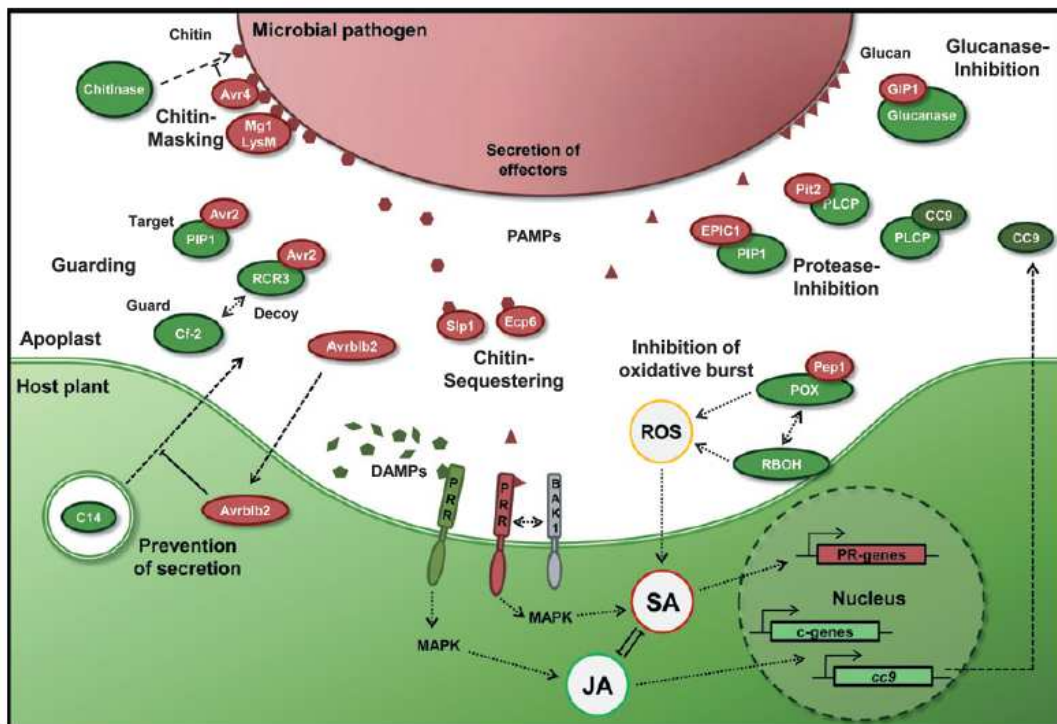


Figura 9: Esquema general de distintos efectores y el papel que desempeñan en la supresión de las defensas de la planta. Abreviaturas usadas en la figura. Efectores microbianos: Avr2, Avr4, Avrblb2, Ecp6, EPIP1, GIP1, Pep1, Pit2. Proteasas de planta: C14, PIP1, PLCP (cisteín proteasa tipo papaína), Rcr3. Enzimas productoras de ROS: POX (peroxidasa), RBOH (homólogo de oxidasa de cadena respiratoria). BAK1 receptor quinasa 1 de *Arabidopsis* asociado a bri1; C-genes, genes de compatibilidad; CC9, cistatina de maíz '*corn cystatin 9*'; Cf-2, proteína de Resistencia de tomate Cf-2; JA, ácido jasmónico; MAPK, proteín quinasa activada por mitógeno; PAMP/DAMP, patrones moleculares asociados a patógenos/daño; PR genes, genes que codifican para proteínas PR; PRR, receptor de reconocimiento de patrones; ROS, especies reactivas del oxígeno; SA, ácido salicílico. Imagen tomada de (Ökmen & Doehlemann, 2014).

Efectores localizados en el citoplasma de la planta

Los efectores citoplasmáticos producidos por los patógenos se translocan al interior de la célula huésped a través de estructuras de infección especializadas como el sistema de secreción tipo III, vesículas de infección o haustorios. Una vez dentro de la célula de la planta, se dirigen a diferentes compartimentos subcelulares donde ejercen su función, incluido el núcleo. Los efectores citoplasmáticos caracterizados hasta el momento se pueden clasificar en función del mecanismo de defensa del huésped que modifican (Giraldo & Valent, 2013). Por una parte existe un grupo de efectores que tienen como diana el sistema de ubiquitinación del huésped. Éste es clave para regular el funcionamiento de la inmunidad en plantas y se han descrito varios ejemplos de proteínas efectoras que lo alteran. El efector AvrPiz-t de *M. oryzae* se une a la proteína APIP6 de la ubiquitín ligasa RING3 para suprimir la inmunidad PAMP inducida por quitina (Park *et al.*, 2012). En *P. infestans*, el efector Avr3 se une a la proteína CMPG1 de la ubiquitín ligasa E3 y de esta forma bloquea la inducción de la muerte celular durante la fase biotrófica de la infección (Bos *et al.*, 2010).

Otros efectores tienen como diana el sistema de señalización de defensa de la planta. El efector Cmu1 de *U. maydis* es una corismato mutasa necesaria para la patogenicidad del hongo y se secreta durante la fase biotrófica de la infección (Djamei *et al.*, 2011). Esta enzima cataliza la conversión del corismato en derivados secundarios que se utilizan para sintetizar aminoácidos aromáticos y de esta forma evita que se produzca ácido salicílico necesario para la respuesta de defensa. Las plantas de maíz infectadas con el mutante delecionado de Cmu1 muestran niveles elevados de ácido salicílico, aumentando significativamente su resistencia al hongo (Djamei *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el efector inhibidor de proteasas Avrblb2 de *P. infestans* que se acumula cerca de los haustorios y bloquea la secreción de la proteasa C14 hacia el apoplasto (Bozkurt *et al.*, 2011). El efector Tin2 de *U. maydis* se une y estabiliza la proteína quinasa ZmTTK1, iniciando la activación de factores de transcripción relacionados con la ruta de biosíntesis de antocianinas (Tanaka *et al.*, 2014). Además, se sugiere que Tin2 redirige metabolitos hacia la vía de las antocianinas, disminuyendo así su disponibilidad para otras respuestas de defensa.

Evolución de los efectores

Planta y patógeno están en constante interacción, manteniendo una lucha coevolutiva y especializándose continuamente en nuevas adaptaciones para combatir al oponente. De esta forma, las proteínas R de la planta detectan los efectores Avr del patógeno provocando una interacción incompatible; pero si por el contrario no los detectan debido por ejemplo a una variación alélica, se produce una interacción compatible (Dodds & Rathjen, 2010). A nivel de dinámica genética poblacional, esta situación se puede representar mediante dos modelos: el modelo de “carrera armamentística” y el modelo de “reina roja” (**Figura 10**).

En el modelo de “carrera armamentística”, tanto el patógeno como la planta desarrollan en continuos ciclos nuevos alelos para efectores y receptores que se fijan en la población de manera temporal (Dawkins & Krebs, 1979; Stahl & Bishop, 2000). En el modelo de “reina roja”, dos o más alelos de un mismo efector se mantienen en la población y aquél alelo que es más útil para el patógeno incrementa su frecuencia. Al mismo tiempo, el alelo del hospedador que mejor proteja frente a ése gen patogénico también incrementa su frecuencia en la población (Terauchi & Yoshida, 2010). En los modelos se requieren adaptaciones continuas y pueden dejar huellas en los genomas que reflejen esta rápida evolución.

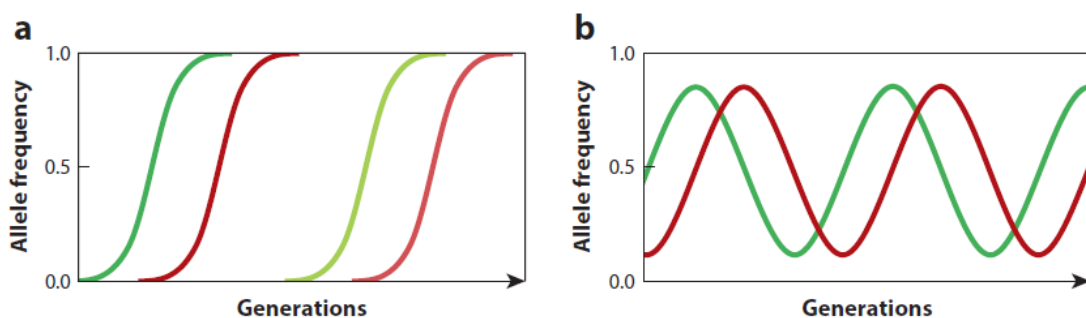


Figura 10: Modelos evolutivos que dirigen la interacción entre planta y patógeno. Las frecuencias alélicas poblacionales de un gen patogénico se representan en línea roja y las frecuencias alélicas de un gen de defensa del hospedador en línea verde. A) Modelo de “carrera armamentística”. B) Modelo de “reina roja”. La fijación de alelos y el desarrollo de nuevos alelos (líneas con colores más claros) en el modelo de “carrera armamentística” contrasta con la fluctuación de las frecuencias alélicas en el modelo de “reina roja”. Imagen tomada de (Lo Presti *et al.*, 2015).

La necesidad de cambiar continuamente el arsenal de efectores implica una presión evolutiva muy fuerte que acelere esta evolución en los patógenos. De esta manera, diversos estudios realizados con genomas de patógenos de plantas han encontrado un alto grado de selección positiva en genes que codifican proteínas secretadas (Stukenbrock & McDonald, 2009; Joly *et al.*, 2010; Stergiopoulos *et al.*, 2014). Un ejemplo reciente ha sido mostrado en *C. graminicola*. Se analizaron varios aislados de esta especie recolectados en distintas localizaciones geográficas y se hallaron evidencias de selección positiva en regiones codificantes y también no codificantes de genes relacionados con patogenicidad, los cuales se encontraban bajo distintas presiones de selección comparados con otros genes (Rech *et al.*, 2014).

En algunas especies de hongos, los genes que codifican efectores se encuentran habitualmente localizados en compartimentos genómicos muy dinámicos como son las regiones subteloméricas, regiones génicas dispersas o mini cromosomas accesorios (Raffaele & Kamoun, 2012). En estas zonas del genoma la plasticidad genética está determinada por diversos mecanismos evolutivos como la recombinación o la actividad de elementos transponibles que provocan reordenamientos cromosómicos. Un ejemplo de estos reordenamientos se observa en el patógeno *V. dahliae*, ya que en distintas cepas del hongo, a pesar de su alto grado de identidad de secuencia, se detectan regiones específicas enriquecidas en efectores relacionados con la virulencia (de Jonge *et al.*, 2013). A diferencia de otros géneros como *Fusarium*, *Magnaporthe* o *Ustilago* (Kämper *et al.*, 2006; Farman, 2007; Ma *et al.*, 2010), en el caso de *Colletotrichum* los genes que codifican efectores se encuentran distribuidos aleatoriamente a través de los cromosomas, y no se han detectado evidencias de que se localicen en agrupamientos enriquecidos en cromosomas particulares o cercanos a regiones teloméricas o elementos transponibles (O'Connell *et al.*, 2012).

Efectores en el género *Colletotrichum*

Dentro del género *Colletotrichum* se han caracterizado diversos efectores implicados en virulencia como los mencionados anteriormente CIH1 o GSL1 (Perfect *et al.*, 1998; Takahara *et al.*, 2009; Oliveira-Garcia & Deising, 2013). El efector CgDN3 de

C. gloeosporioides fue una de las primeras proteínas identificadas en un hongo fitopatógeno que suprime las respuestas de defensa de la planta (Stephenson *et al.*, 2000). Los mutantes delecionados forman apresorios funcionales en la superficie de la hoja pero son incapaces de infectar, elicitando una respuesta HR por parte del huésped. Sin embargo, son capaces de desarrollar hifas necrotróficas sobre hojas previamente dañadas. Todo ello indica que CgDN3 es necesario para suprimir la respuesta de defensa HR del huésped y se encuentra asociado a la fase biotrófica de la infección primaria. NIS1 (*Necrosis-inducing secreted protein 1*) es un efector descubierto en el patógeno de las cucurbitáceas *C. orbiculare*, expresado durante la etapa biotrófica de la infección e implicado en la inducción de la muerte celular en *Nicotiana benthamiana* (Yoshino *et al.*, 2012). La proteína MC69 es también un efector descrito en *C. orbiculare* necesario para la patogenicidad y se encuentra conservada en otros hongos como *M. oryzae*. Se expresa en apresorios e hifas intracelulares primarias y los mutantes delecionados presentan reducción de lesión en hojas de pepino y de *N. benthamiana* (Saitoh *et al.*, 2012).

El efector CINUDIX de *C. lentis* contiene un péptido señal y un dominio hidrolasa Nudix, se localiza exclusivamente en hifa primaria y es capaz de elicitar una respuesta de defensa HR cuando se expresa de forma transiente en hojas de *N. benthamiana*. Este efector ejerce su acción en la membrana plasmática de las células del hospedador y su expresión constitutiva provoca una elevada respuesta HR en el huésped (Bhadauria *et al.*, 2013). En la misma especie se ha descrito recientemente otro efector denominado CIToxB. Este efector es una proteína toxina específica para la planta de lenteja que se secreta en las células del huésped durante el cambio de fase biotrófica a fase necrotrófica para amplificar las señales de muerte celular causadas por CNUDIX (Bhadauria *et al.*, 2015). En *C. higginsianum* se han descrito pequeñas moléculas secretadas por el poro de penetración que forma el apresorio y que actúan suprimiendo las respuestas tempranas de muerte celular de la planta. Estas moléculas efectoras se conocen como ChECs y se secretan en diversas oleadas consecutivas dependiendo de la etapa de la infección (Kleemann *et al.*, 2012).

Por último, en el patógeno del maíz *C. graminicola* se ha caracterizado funcionalmente la proteína CgEP1. Este efector conservado en otras especies de

Colletotrichum, se sintetiza durante las etapas tempranas de la infección y es necesario para la antracnosis en hoja, tallo y raíz. Además, se ha comprobado que este efector tiene una localización en el núcleo del huésped, uniéndose al DNA de forma inespecífica y de esta forma modificando la expresión de multitud de genes, varios de ellos relacionados con la respuesta inmune (Vargas *et al.*, 2016).

Metaloproteasas y serín proteasas relacionadas con la patogenicidad

Las enzimas proteolíticas (proteasas) hidrolizan el enlace peptídico (CO-NH) y están implicadas en muchas funciones fisiológicas, siendo factores esenciales para el control homeostático tanto en eucariotas y procariotas. Muchas de ellas también son agentes tóxicos para el hospedador. De acuerdo con la clasificación MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) las proteasas se clasifican en ocho clases basándose en el grupo funcional de su centro activo, su mecanismo catalítico, su homología de secuencia aminoacídica primaria, su estructura y la posición en la que cortan el enlace peptídico: aspartato (A), glutamato (G), asparagín (N), treonín (T), cisteín (C), serín (S), metaloproteasas (M) y desconocidas (U) (Rawlings & Barrett, 1993). Debido a que este estudio se basa en la caracterización de una metaloproteasa fungalisina y una subtilisina serín proteasa, nos centraremos únicamente en explicar estos dos grupos de proteasas y su relación con la patogenicidad fúngica.

Metaloproteasas

Las metaloproteasas de hongos que contienen un ión de zinc (II) en su centro catalítico representan una gran parte de las proteasas patogénicas. Poseen la secuencia consenso HEXXH como motivo de unión a zinc, con dos residuos de histidina como primer y segundo ligando del zinc (Rawlings *et al.*, 2006). Las metaloproteasas son sintetizadas como precursores inactivos denominados preproenzimas y posteriormente maduran a través de un proceso autocatalítico altamente regulado (Inouye, 1991). Se dividen en dos familias, M35 (deuterolisinas) y M36 (fungalisinas), que comparten pocas similitudes a excepción de su motivo HEXXH. La familia M35 utiliza como tercer ligando del zinc un residuo de aspartato que se localiza en la

secuencia GTXDXXYG cercana al extremo carboxilo, mientras que la familia M36 utiliza un residuo de glutamato localizado en el motivo EXXXD cercano al C-terminal como tercer ligando del zinc (Hori *et al.*, 2001; Rawlings *et al.*, 2006).

En el caso de las bacterias se conoce desde hace mucho la relación entre metaloproteasas y patogenicidad, ya que desempeñan una gran variedad de acciones. En las infecciones locales, las metaloproteasas causan daños necróticos o hemorrágicos en diversos tejidos a través de la digestión de los componentes estructurales de la matriz extracelular. Esto ocurre en tejidos como la córnea o el pulmón cuando son infectados por *Pseudomonas aeruginosa* o *Serratia marcescens* (Kreger & Gray, 1978; Lysterly *et al.*, 1981; Azghani *et al.*, 1990). Muchas especies patogénicas de *Vibrio* también forman lesiones edematosas mediante la generación de mediadores inflamatorios (Miyoshi *et al.*, 1998). En el caso de las infecciones sistémicas, las metaloproteasas vibriolisinas del género *Vibrio* actúan mediante la proteólisis de muchas proteínas plasmáticas, lo cual altera la homeostasis fisiológica y finalmente desencadena un estado inmunocomprometido en el hospedador (Miyoshi & Shinoda, 2000; Miyoshi, 2013).

En el caso de los hongos se conoce mucho menos sobre la relación entre metaloproteasas secretadas y patogenicidad, con la excepción de los hongos dermatófitos (Monod *et al.*, 2002; Monod, 2008; Yike, 2011). Estos hongos filamentosos altamente especializados son los responsables de la mayoría de micosis superficiales en humanos y animales. Su habilidad para secretar altos niveles de proteasas sobre sustratos proteicos les permiten infectar estructuras queratinizadas especializadas como el estrato córneo de la piel, uñas o pelos (Giddey *et al.*, 2007). De esta manera, la actividad proteolítica secretada se considera un factor de virulencia en estos hongos, ya que provocan daños en los tejidos y modifican las defensas del hospedador. El primer ejemplo descrito de una fungalisina de la familia M36 fue la metaloproteasa AfuMep de *Aspergillus fumigatus*, patógeno causante de aspergilosis pulmonar (Monod *et al.*, 1993; Jatón-Ogay *et al.*, 1994; Markaryan *et al.*, 1994; Sirakova *et al.*, 1994) y cuya estructura ha sido recientemente cristalizada (Fernández *et al.*, 2013). Se compone de una cadena polipeptídica de unos 380 aminoácidos (42kDa) y es sintetizada como preproteína con un propéptido largo de 230

aminoácidos aproximadamente que se procesa posteriormente. Esta fungalisina es capaz de hidrolizar tejidos como elastina, laminina o colágeno. La observación mediante microscopía electrónica demostró que su secreción se producía durante la invasión del tejido pulmonar de ratón, lo que sugería una relación patogénica (Markaryan *et al.*, 1994). En otras especies de dermatófitos como *Microsporum canis* o *Trichophyton rubrum* también se ha sugerido que existe una relación entre Mep y patogenicidad aunque no se ha demostrado en ninguno de ellos (Brouta *et al.*, 2001; Giddey *et al.*, 2007; Leng *et al.*, 2009). Sin embargo sí se ha descrito recientemente que esta familia de metaloproteasas M36 actúa como un factor de virulencia importante en *Trichophyton mentagrophytes* (Zhang *et al.*, 2014) y en el patógeno oportunista causante de la meningitis *Cryptococcus neoformans* (Vu *et al.*, 2014). Estudios filogenéticos recientes basados en la familia de hongos dermatófitos Onygenales, que comprende géneros patógenos importantes como *Microsporum*, *Trichophyton* o *Coccioides*, sugiere la posibilidad de realizar nuevos estudios con estas especies ya que muestran evidencias de selección positiva en estas dos familias de metaloproteasas que se encuentran en expansión (Li *et al.*, 2012; Li & Zhang, 2014).

En especies de hongos fitopatógenos el vínculo entre metaloproteasas y patogenicidad también ha sido sugerido en el pasado por algunas investigaciones. Lange y colaboradores observaron que durante la infección con *F. solani* f. sp. *phaseoli* en raíz de judía se producía el procesamiento proteolítico de varias quitinasas (Lange *et al.*, 1996). De forma más específica se demostró que la metaloproteasa Avr-Pita del patógeno de arroz *M. oryzae* se comportaba como un factor de avirulencia, cuya unión al receptor Pita provocaba una respuesta de defensa en la planta (Jia *et al.*, 2000). Otro ejemplo es el efector BEC1019 del patógeno de cebada *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Whigham *et al.*, 2015). Esta metaloproteasa secretada por los haustorios del patógeno es necesaria para la colonización, puesto que mutantes con silenciamiento de BEC1019 inducido por virus muestran una acumulación reducida de hifas sobre las hojas de cebada. Además, también tiene un importante papel en virulencia ya que suprime la respuesta HR de distintas líneas de cebada con HR inducida constitutivamente (Whigham *et al.*, 2015).

Pero ha sido recientemente cuando se ha descrito el papel que desempeña la metaloproteasa fungalisina en los organismos fitopatógenos. A través de diversos estudios con diferentes patógenos de maíz como *F. verticilloides*, *Bipolaris zeicola* y *Stenocarpella maydis* se ha definido el mecanismo bioquímico a través del cual actúa. De esta forma la fungalisina es capaz de truncar las quitinasas A y B de clase IV del maíz mediante proteólisis directa, cortando un enlace peptídico glicina-cisteína muy conservado que se encuentra en la región bisagra que separa el dominio de unión a quitina (CBD) y el dominio quitinasa (Naumann *et al.*, 2009, 2011). Además de las especies indicadas, también ha sido descrita actividad fungalisina en patógenos de Brassicáceas como *Alternaria brassicicola*, *F. oxysporum f. sp. conglutinans*, *V. dahliae*, *Pyrenopeziza brassicae* y *C. higginsianum* (Naumann & Wicklow, 2013a). En otro estudio reciente se demostró que los patógenos de tomate *B. cinerea* y *F. oxysporum f. sp. lycopersici* secretaban proteasas que modificaban las quitinasas con CDB de tomate (Karimi Jashni *et al.*, 2015). En *F. oxysporum f. sp. lycopersici* es necesaria la acción sinérgica de una serín proteasa FoSep1 y una metaloproteasa FoMep1 para cortar el dominio CDB de dos quitinasas de tomate, observándose posteriormente una reducción en la actividad antifúngica de estas dos quitinasas sin dominio CBD. Además, los dobles mutantes de FoSep1 y FoMep1 mostraron una reducción en la virulencia en tomate (Karimi Jashni *et al.*, 2015).

Serín proteasas

Las serín proteasas son el grupo más amplio y estudiado de proteasas. Aproximadamente un tercio de las proteasas conocidas pertenecen a este grupo y se encuentran presentes en todos los organismos (Siezen *et al.*, 1991; Siezen & Leunissen, 1997; Page & Di Cera, 2008). De acuerdo con la base de datos MEROPS se clasifican en 35 familias, de las cuales la S8 pertenece a las proteasas tipo subtilisina (subtilasas) (Rawlings *et al.*, 2006). Las subtilisinas S8 se caracterizan por poseer en su centro catalítico la tríada de aminoácidos aspartato, histidina y serina (Dodson & Wlodawer, 1998). Se pueden dividir en dos subfamilias; la subfamilia S8A que incluye las verdaderas subtilisinas y la subfamilia S8B que comprende las subtilisinas tipo kexina, como por ejemplo las preproteínas convertasas. La mayoría de las subtilisinas S8 de animales, plantas, bacterias y hongos poseen una estructura multidominio, que

comprende un péptido señal, un propéptido, un dominio peptidasa S8 y frecuentemente uno o más dominios adicionales como dominios P, PA, inhibidores I9, DUF 1034, DUF 1043, α -1,3 glucanasa, quitinasa clase II, pectina liasa, ciclina, citocromo P450, glicosil hidrolasa 71, glicosil hidrolasaa 18, Sir2, actividad pro kuma y sac ganp (Siezen & Leunissen, 1997; Antão & Malcata, 2005; Siezen *et al.*, 2007) .

Las subtilisinas son especialmente abundantes en las plantas, con 63 genes en *Zea mays* y *Oryza sativa*, 56 genes en *A. thaliana* y al menos 15 genes en *Lycopersicon esculentum* (Meichtry *et al.*, 1999; Rautengarten *et al.*, 2005; Tripathi & Sowdhamini, 2006). Comparten muchas propiedades con sus homólogos en bacterias y animales, pero tienen algunas características estructurales y bioquímicas particulares que las diferencian, como el dominio PA necesario para la interacción proteína-proteína y la especificidad de sustrato (Mahon & Bateman, 2000; Luo & Hofmann, 2001; Schaller *et al.*, 2012). Las funciones de las subtilisinas son muy variadas, y en el caso de las plantas están relacionadas con procesos de desarrollo (Beilinson *et al.*, 2002), diferenciación (Zhao *et al.*, 2000), muerte celular programada (Coffeen & Wolpert, 2004; Chichkova *et al.*, 2010) o interacción con patógenos (Chichkova *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2014; Lozano-Torres *et al.*, 2014). En las interacciones planta-patógeno el primer ejemplo descrito fueron las subtilisinas P69B y P69C del tomate, las cuales se inducían frente al ataque por viroides (Tornero *et al.*, 1996a) y posteriormente activaban repuestas de defensa (Tornero *et al.*, 1996b). Otras subtilisinas de plantas, conocidas como saspasas y fitaspasas, están relacionadas con procesos de PCD para hacer frente a los patógenos (Coffeen & Wolpert, 2004; Chichkova *et al.*, 2010, 2012; Vartapetian *et al.*, 2011). Un ejemplo reciente de estas subtilisinas es la proteína StSBTc-3 de *Solanum tuberosum*. Fue aislada a partir de hojas de patata infectadas con *P. infestans* y se demostró que poseía actividad caspasa-3 análoga a las caspasas de los animales. Además, se comprobó *in vitro* que era capaz de inducir procesos de muerte celular en células de tomate para impedir el crecimiento del patógeno (Fernández *et al.*, 2015). Por último, otra de las implicaciones de las subtilisinas de las plantas relacionadas con patogenicidad es la inducción del fenómeno inmunitario conocido como “priming” (Beckers & Conrath, 2007; Conrath, 2011). Consiste en un nivel basal de inmunidad en el cual la planta está preparándose para un

ataque futuro pero sin que el patógeno esté presente (Conrath *et al.*, 2002). El “priming” produce un estado fisiológico que permite a la planta responder más rápido y/o de forma más precisa a un ataque. Los estímulos que desencadenan respuestas de “priming” son muy variados como por ejemplo patógenos avirulentos, insectos herbívoros, moléculas derivadas de microbios o del propio huésped, sustancias sintéticas que alteran el metabolismo de la planta y estreses abióticos (Conrath *et al.*, 2006). La subtilisina de *Arabidopsis* SBT3.3 es homóloga de la subtilisina P69C de tomate y se expresa rápidamente tras la infección por patógenos activando genes de respuesta a ácido salicílico. Se ha demostrado que esta SBT3.3 es capaz de mantener en un nivel basal este circuito de retroalimentación positivo una vez que se ha desencadenado la respuesta de defensa, manteniendo las células de la planta lo suficientemente alerta para responder rápidamente frente a una exposición futura del patógeno (Ramírez *et al.*, 2013).

Las subtilisinas se consideran importantes factores de virulencia en las infecciones de hongos entomopatógenos, micoparásitos y nematófagos (St. Leger *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2009). En el caso de los hongos fitopatógenos se conoce mucha menos información acerca de la influencia que ejercen las subtilisinas en la patogenicidad. *Leptosphaeria maculans*, el patógeno fúngico de *Brassica napus*, expresa la subtilisina SP2 durante el proceso de infección en hoja y tejido vascular (Wilson & Howlett, 2005). Otro ejemplo es la subtilisina Mp1 de *M. poae*, la cual se expresa de forma elevada en raíces infectadas de *Poa pratensis*. Además, la detección de Mp1 en raíces infectadas se correlacionó con una mayor severidad en los síntomas foliares, lo que sugiere una implicación en la patogenicidad (Sreedhar *et al.*, 1999). La subtilisina SPM1 de *M. oryzae* también se ha relacionado con la patogenicidad en arroz, ya que está implicada en el proceso de autofagia mediada por vacuolas. Además, los mutantes delecionados muestran deficiencias en varios procesos relacionados con la infección como germinación, formación de apresorios, colonización y crecimiento dentro del huésped (Donofrio *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2009). En el hongo patógeno del castaño *Cryphonectria parasitica*, la subtilisina Prb1 se ha identificado como un factor de virulencia necesario para la infección. Los mutantes delecionados en Prb1 mostraban una reducción en el nivel de esporulación y

capacidad de virulencia respecto al aislado silvestre. Además, estos mutantes presentaban una acumulación de cuerpos autofágicos en su interior, los cuales se asocian con patogenicidad y mostraban una reducción en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización mediada por la proteína G heterotrimérica (Shi *et al.*, 2014). Otro estudio demostró que una serín proteasa extracelular de *F. solani f. sp. eumartii* degradaba *in vitro* dos proteínas PR (una quitinasa y una β -1,3 glucanasa) de los fluidos extracelulares de patata, sugiriendo también su relación con el proceso de infección (Olivieri *et al.*, 2002). Por último, también se ha demostrado que algunas subtilisinas fúngicas como la AsES son capaces de elicitar en el huésped respuestas de defensa (Chalfoun *et al.*, 2013). Esta subtilisina fue purificada a partir de un aislado avirulento de *Acremonium strictum*, patógeno de *Fragaria x ananassa* (fresa). Se observó que el tratamiento con AsES en plantas de fresa y *A. thaliana* producía una inducción de los genes de defensa y producción de ROS, respectivamente. Además, plantas de fresa pretratadas con AsES mostraron una resistencia mucho mayor al patógeno *B. cinerea* en comparación con los controles, sugiriendo que esta subtilisina AsES quizá pueda actuar como elicitor de la respuesta ETI (Chalfoun *et al.*, 2013).

Tabla 1. Principales efectores de oomicetos y hongos filamentosos. Modificado de (Rovenich *et al.*, 2014).

Efeotor	Organismo	Diana	Función
BEC4	<i>Blumeria graminis</i> <i>f.sp. hordei</i>	Proteínas ARF-GAP	Interfiere con el tráfico de vesículas del hospedador
Avr2	<i>Cladosporium fulvum</i>	Cisteín proteasas	Inhibición de cisteín proteasas
Avr4	<i>Cladosporium fulvum</i>	Quitina	Protección de las hifas
Ecp6	<i>Cladosporium fulvum</i>	Quitina	Alteración de la inmunidad mediada por quitina
CfTom1	<i>Cladosporium fulvum</i>	α -Tomatina	Detoxificación
CgEP1	<i>Colletotrichum graminicola</i>	No específica	Alteración de la inmunidad
DN3	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Componente de señalización de la ruta de muerte celular inducida por NIS1	Supresión de muerte celular inducida por NIS1
SEC4	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Desconocido	Exocitosis y tráfico vesicular
SEC22	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Desconocido	Tráfico vesicular
CNUDIX	<i>Colletotrichum lentis</i>	Desconocido	Elicita respuesta HR
Gr-Vap1	<i>Globodera rostochiensis</i>	Proteasa Rcr3	Inhibición de cisteín proteasas
MiSSP7	<i>Laccaria bicolor</i>	JAZ6	Desregulación de la expresión génica del huésped
AvrPiz-t	<i>Magnaporthe</i>	APIP6 de ubiquitin	Supresión de MTI

	<i>oryzae</i>	ligasa E3 RING	
Slp1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Quitina	Alteración de la inmunidad mediada por quitina
MfAvr4	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Quitina	Protección de las hifas
Mg1LysM	<i>Zimoseptoria tritici</i>	Quitina	Protección de las hifas
Mg3LysM	<i>Zimoseptoria tritici</i>	Quitina	Alteración de la inmunidad mediada por quitina
Avr3a	<i>Phytophthora infestans</i>	CMPG1	Estabilización de la ligasa E3
Avrblb2	<i>Phytophthora infestans</i>	Proteasa C14	Supresión de la secreción de proteasas
EPI1	<i>Phytophthora infestans</i>	Serín proteasas	Inhibición de serín proteasas
EPI10	<i>Phytophthora infestans</i>	Serín proteasas	Inhibición de serín proteasas
EPIC1	<i>Phytophthora infestans</i>	Cisteín proteasas	Inhibición de cisteín proteasas
EPIC2B	<i>Phytophthora infestans</i>	Cisteín proteasas	Inhibición de cisteín proteasas
GIP1	<i>Phytophthora sojae</i>	β -1,3-Glucanasas	Inhibición de glucanasas
RTP1p	<i>Uromyces fabae/U. striatus</i>	Proteasas	Inhibición de proteasas
Cmu1	<i>Ustilago maydis</i>	Cm2	Modificación de la síntesis de SA
Pep1	<i>Ustilago maydis</i>	POX12	Inhibición de la producción de ROS mediada por peroxidasas
Pit2	<i>Ustilago maydis</i>	Proteasas CP2, CP1A/B, XCP2	Inhibición de cisteín proteasas
Tin2	<i>Ustilago maydis</i>	TmTTK1	Control de la biosíntesis de antocianinas

HYPOTHESES AND OBJECTIVES

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS I

El gen *Cgfl* de *Colletotrichum graminicola* codifica para una metaloproteasa fungalisina que actúa como efector implicado en patogenicidad y supresión de la respuesta inmune mediada por quitina del huésped.

Objetivo I.A

Determinar la distribución filogenética de las metaloproteasas fungalisinas entre los hongos ascomicetos.

Objetivo I.B

Caracterizar el perfil de expresión génica de *Cgfl* mediante diferentes aproximaciones.

Objetivo I.C

Obtener transformantes nulos y de expresión constitutiva del gen *Cgfl* y estudiar su comportamiento durante la infección en hoja y raíz de maíz.

Objetivo I.D

Determinar la expresión de *Cgfl* en relación con otros efectores implicados en la alteración de la inmunidad mediada por quitina en la planta.

HIPÓTESIS II

El gen *CPLS* de *Colletotrichum graminicola* codifica para una proteasa subtilisina S8A transferida horizontalmente de plantas al ancestro del género *Colletotrichum* y actúa como efector.

Objetivo II.A

Determinar la distribución filogenética de la CPLS entre los hongos ascomicetos.

Objetivo II.B

Caracterizar el perfil de expresión génica de *CPLS* mediante diferentes aproximaciones.

Objetivo II.C

Obtener transformantes nulos y de expresión constitutiva del gen *CPLS* y estudiar su implicación en el proceso de patogenicidad en hoja y raíz de plantas de maíz.

Objetivo II.D

Estudiar el patrón de expresión de genes relacionados con la defensa en plantas de maíz inoculadas con los transformantes nulos en *CPLS*.

HIPÓTESIS III

El gen *CgEP3* de *Colletotrichum graminicola* codifica para una proteína efectora sujeta a presiones evolutivas asimétricas y se encuentra implicada en el proceso de patogenicidad.

Objetivo III.A

Caracterizar la estructura de la proteína CgEP3 así como determinar su distribución filogenética.

Objetivo III.B

Caracterizar el perfil de expresión génica de *CgEP3* mediante diferentes aproximaciones.

Objetivo III.C

Obtener transformantes nulos del gen *CgEP3* y estudiar su implicación en el proceso de patogenicidad en plantas de maíz.

ESQUEMA TEMÁTICO

Esta Tesis Doctoral se encuentra dividida en tres capítulos principales. Cada uno de ellos ha sido escrito en formato de publicación científica, incluyendo resumen, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y material suplementario en idioma inglés.

En el capítulo I se describe el análisis llevado a cabo para la caracterización de una metaloproteasa fungalisina de *C. graminicola*. Para lograr los objetivos de este capítulo se determinó la distribución filogenética de este gen y su patrón de expresión durante la infección *in planta*. Además, se obtuvieron transformantes delecionados en este gen y se determinó su virulencia mediante inoculaciones en hoja y raíz de maíz. Por último, también se estudió la relación de la metaloproteasa fungalisina con otros efectores fúngicos implicados en la respuesta inmunitaria relacionada con la quitina (CTI) de la planta.

El capítulo II está dedicado al estudio y caracterización de una subtilisina serín-proteasa denominada CPLS, transferida horizontalmente desde plantas a un ancestro del género *Colletotrichum*. Para determinar su distribución de manera actualizada, se realizaron análisis filogenéticos con los nuevos genomas disponibles en las bases de datos públicas. También se estudió el patrón de expresión del gen *CPLS* durante la infección a través de diferentes estrategias. Además, se consiguió la obtención de mutantes nulos en el gen *CPLS*, los cuales fueron analizados a través de ensayos de patogenicidad *in planta*. Se observó que las lesiones producidas en las hojas por la cepa delecionada en el gen *CPLS* mostraban un fenotipo hipervirulento. Por último, se analizó la relación de la CPLS con el proceso de PCD en plantas. Los patrones de transcripción de dos genes de maíz codificantes de proteínas receptoras inmunes CC-NLR implicadas en respuesta de señalización y PCD fueron analizados, y los resultados obtenidos muestran una posible relación de la CPLS en la supresión de este proceso en la planta durante las etapas biotrófica y necrotrófica de la infección de *C. graminicola*.

En el capítulo III se describe el estudio evolutivo y funcional de la proteína CgEP3 de *C. graminicola*. Fue previamente identificada en un estudio anterior basado en la búsqueda de proteínas efectoras con localización nuclear codificadas en el genoma de

C. graminicola. El análisis de su secuencia reveló que está compuesto por un péptido señal de secreción, una región N-terminal con semejanza parcial a proteínas con dominio nucleósido fosforilasa (NP), un dominio C-terminal altamente básico y una secuencia de localización nuclear. Los análisis filogenéticos y de secuencia que se llevaron a cabo demostraron que los dominios N-terminal y C-terminal están sujetos a presiones evolutivas asimétricas. El análisis del perfil transcripcional de *CgEP3*, así como la microscopía indicaron que el gen se expresa durante las etapas tempranas de la infección. Por último, se obtuvieron transformantes delecionados en este gen y se determinó su implicación en el proceso de patogenicidad mediante inoculaciones en hoja de maíz.

Finalmente se presentan las conclusiones generales obtenidas a partir de los capítulos previamente descritos.

Nota: Los archivos adicionales (**additional files**) se encuentran incluidos en la versión digital de esta tesis.

CHAPTER I

**A highly conserved
metalloprotease effector enhances
virulence in the maize anthracnose
fungus *Colletotrichum graminicola***

Abstract

Colletotrichum graminicola causes maize anthracnose, an agronomically important disease with a worldwide distribution. We have identified a fungalysin metalloprotease (Cgfl) with a role in virulence. Transcriptional profiling experiments and live cell imaging show that *Cgfl* is specifically expressed during the biotrophic stage of infection. To determine whether Cgfl has a role in virulence, we obtained null mutants lacking *Cgfl* and performed pathogenicity and live microscopy assays. The appressorium morphology of the null mutants is normal, but they exhibit delayed development during the infection process on maize leaves and roots, showing that *Cgfl* has a role in virulence. *In vitro* chitinase activity assays of leaves infected with wild-type and null mutant strains show that, in the absence of Cgfl, maize leaves exhibit increased chitinase activity. Phylogenetic analyses show that Cgfl is highly conserved in fungi. Similarity searches, phylogenetic analysis and transcriptional profiling show that *C. graminicola* encodes two LysM domain-containing homologs of Ecp6, suggesting that this fungus employs both Cgfl-mediated and LysM protein-mediated strategies to control chitin signaling.

Introduction

Maize (*Zea mays L.*) is one of the most important crops worldwide (Wu & Guclu, 2013). In addition to its agronomic importance, maize has been a classic model organism for fundamental research for nearly a century (Strable & Scanlon, 2009). *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. causes anthracnose stalk rot and anthracnose leaf blight of maize (Jamil & Nicholson, 1991; Bergstrom & Nicholson, 1999), producing annual yield losses of more than one billion dollars in the US alone (Frey *et al.*, 2011). The incidence of maize anthracnose is likely to increase as a result of climate change and changes in agriculture practices, threatening global food security (Munkvold, 2002; Frey *et al.*, 2011).

Plants possess a variety of mechanisms to defend themselves against pathogens. One mechanism involves the secretion of hydrolytic enzymes, such as chitinases, which target components of the fungal cell wall. These enzymes can degrade structural components of the cell wall, such as chitin, rendering the cell wall unstable. Many chitinases are classified as pathogenesis-related (PR) proteins, as they are induced in response to infection by pathogens (Kasprzewska, 2003; van Loon *et al.*, 2006).

Chitinases also have the secondary effect of releasing chitin, which acts as a pathogen- or microbe-associated molecular pattern (PAMP/MAMP). Because of the crucial role of chitin for the activation of the plant immune system, fungi have evolved mechanisms to suppress this signal (Bolton *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012). A broad diversity of plant-associated fungi secrete LysM domain-containing proteins in order to stop the chitin-mediated activation of the plant immune system. LysM motifs, also known as CBM50 carbohydrate-binding modules, bind to chitin and peptidoglycans, thereby masking their recognition by plant receptors (de Jonge & Thomma, 2009). In this context, the *C. graminicola* and *C. higginsianum* genomes encode more proteins with CBM50 modules than all other fungi examined (O'Connell *et al.*, 2012). The tomato leaf mould pathogen *Cladosporium fulvum* secretes apoplastic chitin-binding effectors, such as Ecp6. This protein contains three LysM

domains which bind chitin fragments released from degraded cell walls by host chitinases in order to suppress the activation of plant defence receptors (Bolton *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2010).

In addition to LysM-containing proteins, fungi may possess other mechanisms for the control of chitin-mediated activation of plant defenses (Naumann *et al.*, 2011). Recently, our group has identified several putative effector proteins in *C. graminicola* (Rech *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2016), and we are actively studying their roles in causing plant disease. One of the putative effectors encodes a metalloprotease belonging to the M36 family of fungalysins. Fungalysins are a group of metalloproteases that belong to MEROPS family M36 (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

The first fungalysin was described from the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*, which causes aspergillosis by the degradation of lung tissue through proteolytic activity (Monod *et al.*, 1993). Fungalysins are reported to be potential virulence factors in pathogenic dermatophytes that colonize keratinized structures (Brouta *et al.*, 2002; Jousson *et al.*, 2004). Recently, a fungalysin from *Fusarium verticillioides* has been shown to cleave within a conserved sequence in class IV plant chitinases Chit A and Chit B, thereby establishing the biochemical function for this protein (Naumann *et al.*, 2011). Subsequently, researchers have shown that fungalysins from a number of pathogens of monocot and dicot plants have the same function, truncating these chitinases and producing the same degradation products (Naumann & Price, 2012; Naumann & Wicklow, 2013a; Karimi Jashni *et al.*, 2015).

There are several examples of metalloproteases from plant pathogens that have roles in virulence (Zhang *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2000). Perhaps the best known example is Avr-Pita, a zinc (Zn) metalloprotease from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Avr-Pita is recognized by a cytoplasmic resistance (R) gene-encoded protein that triggers a signaling cascade leading to resistance (Jia *et al.*, 2000). The *C. graminicola* gene *Cgfl* (GLRG_06543) was originally identified by (Vargas *et al.*, 2012) as a secreted fungalysin that is strongly up-regulated during the early stages of infection (O'Connell *et al.*, 2012). Together, the contribution of metalloproteases to pathogenicity in other plant pathogens, the involvement of fungalysins in the pathogenicity of animal pathogens (Mathy *et al.*, 2010) and the

characteristic expression pattern in *C. graminicola* suggest that fungalysins play an important role in infection and anthracnose development.

In the present study, we show that fungalysins are a conserved family of metalloproteases found in a broad range of fungi. The *C. graminicola* fungalysin encoding gene *Cgfl* is only expressed in biotrophic hyphae during colonization of the plant. Pathogenicity and live cell imaging carried out with *Cgfl* null mutants show that this gene has an important role in virulence on maize leaves and roots. Using *in vitro* assays, we also show that *Cgfl* null mutants exhibit decreased proteolytic activity. Maize leaves inoculated with the *Cgfl* null mutants exhibit increased chitinase activity, consistent with the role of fungalysins as chitinase-degrading enzymes. Together, our evidence shows that *Cgfl* plays an important role in the plant-fungus interaction and highlights its importance for successful plant colonization.

Results

GLRG_06543 is predicted to encode a chitinase-degrading fungalysin metalloprotease, *Cgfl*.

Analysis of the GLRG_06543 amino acid sequence with InterProScan shows that it encodes an 18-amino-acid signal peptide, a fungalysin/thermolysin propeptide (FTP) domain (Markaryan *et al.*, 1994), which is predicted to be cleaved to generate the active protein, and the fungalysin M36 peptidase domain. The M36 peptidase domain is responsible for catalytic activity and contains the HEXXH motif characteristic of Zn metalloproteases (**Fig. 11a**). Analysis of the predicted mature protein with the Phyre2 protein fold recognition server shows that 389 residues (95%) are modelled with 100% confidence using the structure of mep, a fungalysin from *A. fumigatus*, as a template. We aligned the mature protein to fungalysins of fungal pathogens that have been shown experimentally to degrade *Z. mays* class IV A and B chitinases (Naumann *et al.*, 2009, 2011; Naumann & Price, 2012; Naumann & Wicklow, 2013a; Karimi Jashni *et al.*, 2015). The alignment reveals strong sequence conservation in the catalytic HEXXH

motif, and the residues implicated in the protein-protein interaction (**Fig. 11b**), suggesting that Cgfl functions in a similar manner to the other fungalysins.

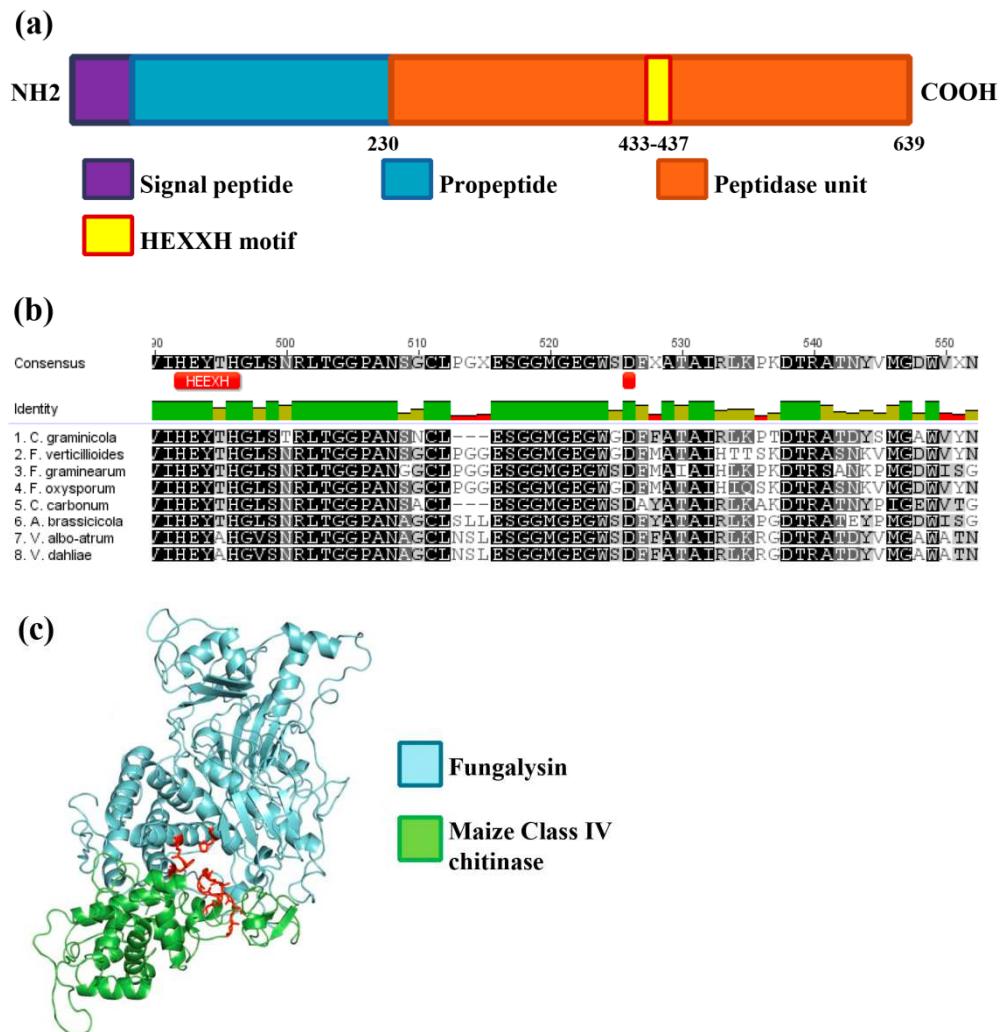


Figure 11. Structure of Cgfl. **a)** Schematic view of Cgfl protein domains. **b)** A portion of a multiple sequence alignment of fungalysins from diverse pathogenic fungi that have been shown previously to degrade chitinases. The conserved catalytic site HEXXH is present in all of them, as are the residues implicated in catalytic activity, Glu465 and His524. **c)** Predicted interaction model between *C. graminicola* fungalysin (blue) and *Z. mays* class IV chitinase ACX37090.1 (green) made with the Phyre2 server. The residues implicated in catalytic activity are shown in red.

Members of the M36 fungalysin family in other filamentous fungi are known to degrade chitinases (Naumann *et al.*, 2009, 2011, Naumann & Wicklow, 2010b, 2013a; Naumann & Price, 2012; Karimi Jashni *et al.*, 2015). To determine whether GLRG_06543 encodes a chitinase-binding protein, we predicted the three-dimensional

structure of *Z. mays* class IV chitinase ACX37090.1 using the Phyre2 server (Kelley & Sternberg, 2009) and compared its structure with that of Cgfl. The predicted model shows that three residues are important in the fungalysin-chitinase interaction: His433, Glu465 and His524 (**Fig. 11c**). Based on the strong sequence and structural similarity of GLRG_06543 to known chitinase-degrading fungalysins, we conclude that this locus encodes a fungalysin and named the protein Cgfl (*C. graminicola* fungalysin).

Cgfl is evolutionarily conserved in fungi

In the MEROPS peptidase database, fungalysins are classified as family M36 and examination of this family reveals that members are widely distributed in both fungi and bacteria. A search of the OrthoDB database (Waterhouse *et al.*, 2013) revealed that Cgfl belongs to group EOG7RV9QR (OrthoDV V7). This group has an evolutionary rate of 1.01, approximately the average of all of the clusters in the database. Previously, we have performed a comparative analysis of the genomes of seven *C. graminicola* isolates (Rech *et al.*, 2014) and a re-examination of the supplementary data revealed that the fungalysins of all seven isolates show 100% identity. Taken together, these data show that fungalysins do not have an unusually fast rate of evolution, as has been revealed in some effector coding gene families. The study by Rech *et al.* also revealed that both the 5' and 3' regions of *Cgfl* contain substitutions that are consistent with positive Darwinian selection. Both the 5' and 3' flanking regions are known to be important for transcriptional regulation and transcript stability, suggesting that, instead of selection for mutations that affect the protein, there has been selection for mutations that affect the transcription of the gene.

We constructed a multi-gene phylogeny of several representative species in the Sordariomycetes (**Fig. 12**). The phylogeny reveals at least four losses of fungalysins during the evolution of the Sordariomycetes. One gene loss event is within a lineage of fungi that includes *Neurospora*, *Myceliophthora* and others. All of the species in this lineage are saprophytes, suggesting a link between the presence of the fungalysin and the ability to infect plants. Two other species, *Grossmania clavigera* and *Cryphonectria parasitica* lack fungalysins, both of which are tree pathogens. Several species,

including *C. gloeosporioides* and two *Verticillium spp.*, contain two fungalysin genes, indicating that a gene duplication occurred during the evolution of these fungi. We constructed a gene tree of the fungalysin family within the Sordariomycetes (**Fig. 13**). The phylogeny reveals evidence that the gene duplication probably occurred prior to the appearance of the Sordariomycetes, with numerous losses of the second gene copy in most of the family.

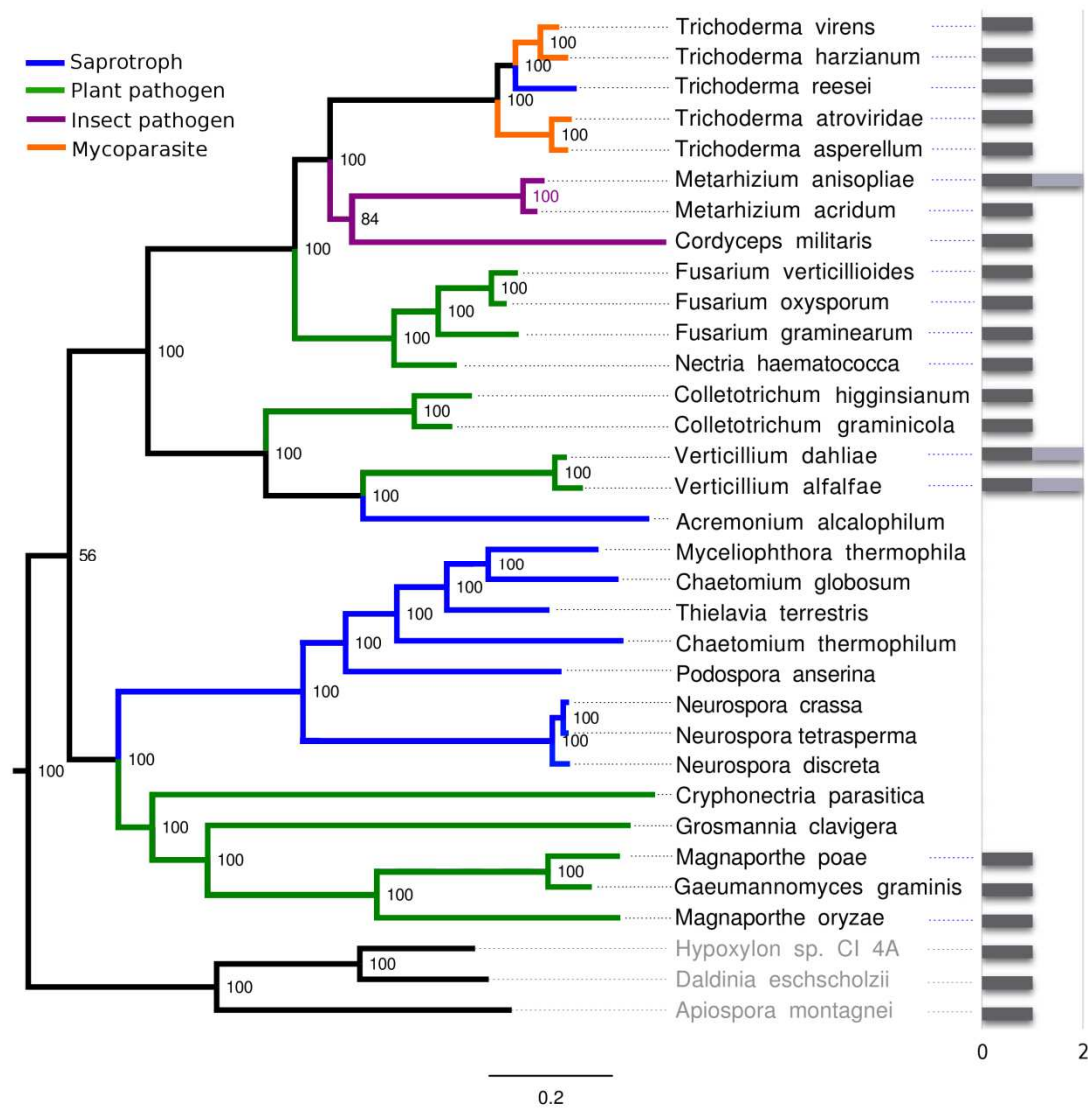


Figure 12. Phylogenetic tree of fungalysins in the Sordariomycetes. Grey bars represent the gene copy number in each species. Most members of the Sordariomycetes contain a single fungalysin, but gene losses and duplications have occurred. Most gene losses are in saprotrophs, with a few exceptions. Internal node labels indicate percentage of bootstrap support.

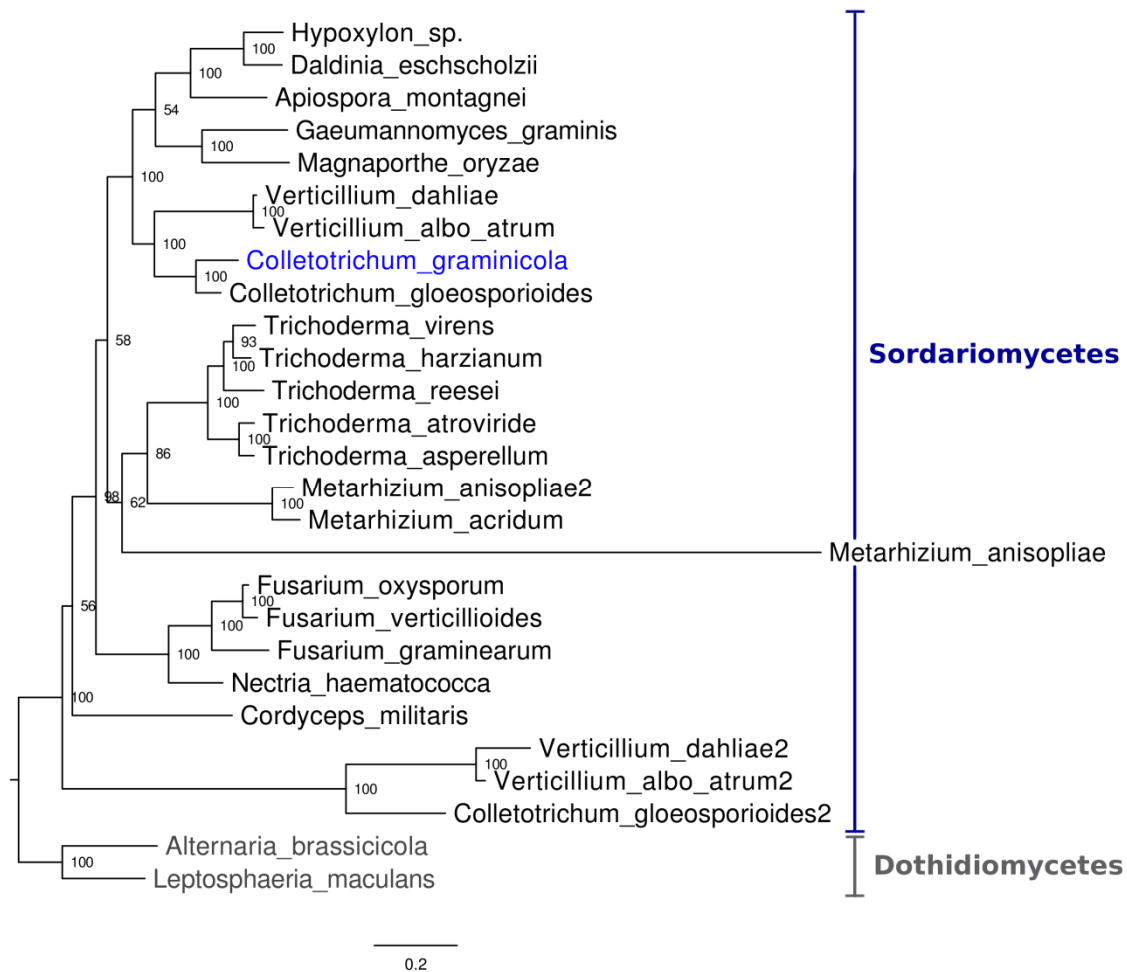


Figure 13. Phylogenetic analysis of *Cgfl* homologs in the Sordariomycetes. Two species of Dothidiomycetes were used as outgroup.

***Cgfl* is expressed in primary hyphae**

The infection of maize leaves by *C. graminicola* begins with a biotrophic phase in which the fungus develops primary hyphae that are irregularly shaped, relatively wide in diameter and that colonize host tissues without causing cell death. The biotrophic hyphae colonize several host cells and, after approximately 48-60 hours, the biotrophic hyphae begin to give rise to narrow, necrotrophic secondary hyphae that eventually cause cell death. By 72 hours post-infection (hpi) (Vargas *et al.*, 2012), most of the hyphae in the central part of the lesion are necrotrophic. As the lesion expands, the leading hyphae are biotrophic and, behind the advancing hyphae, the necrotrophic hyphae colonize plant cells (O'Connell *et al.*, 2012).

To analyse the expression of *Cgfl* during the infection process, we performed quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays using maize leaves inoculated with the *C. graminicola* wild-type (WT) M1.001 strain. The expression of *Cgfl* was quantified at 12 hour intervals from 12 hpi to 72 hpi, with final samples taken at 8 days post-infection (dpi). Mycelium grown on potato dextrose broth (PDB) and conidia were also included. No *Cgfl* gene expression was evident in *in vitro*-cultured mycelium or in conidia. During the infection process, gene expression is evident at 36 hpi and reaches a peak at 60 hpi when the majority of the hyphae are biotrophic. After 60 hpi, the level of expression is reduced but expression still occurs at low levels up to 8 dpi (Fig. 14). There is a correlation between the expression profile of *Cgfl* and the relative abundance of biotrophic hyphae in colonized plant tissue.

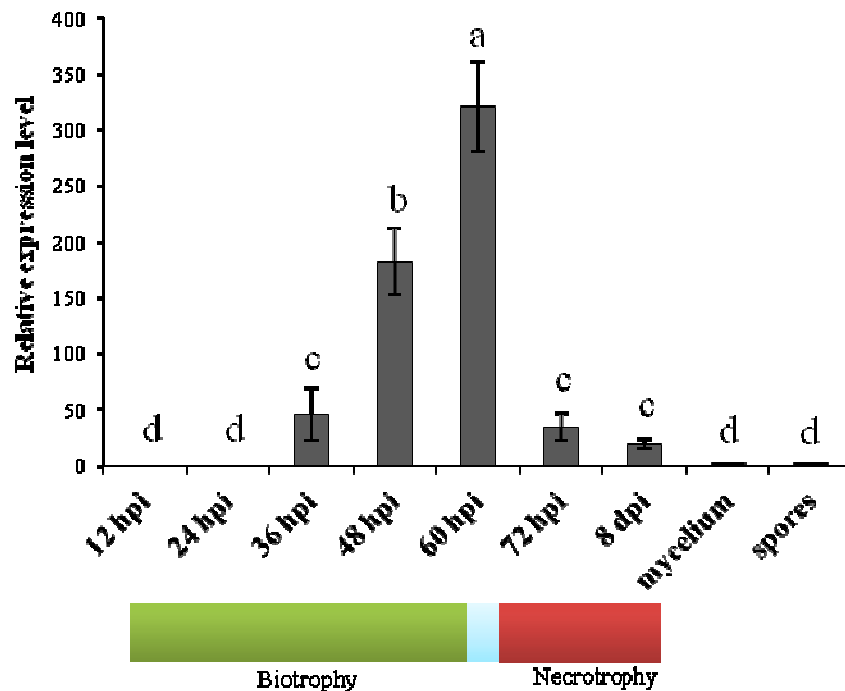


Figure 14. Quantitative RT-PCR analysis of *Cgfl* expression during anthracnose development. RNA samples were extracted from leaves infected with the WT M1.001 strain. The transcript levels of *Cgfl* were normalized to the constitutively expressed *C. graminicola* histone *H3* gene. Bars ± standard deviation (SD) denote mean expression values of three biological replicates, and different letters indicate significant differences according to Tukey's honestly significant difference (HSD) analysis ($P < 0.05$). A 29-cycle threshold (Ct) cycle was used as the maximum limit of detection and the spore value was denoted as reference for the analysis.

To further study the *Cgfl* expression *in planta*, we engineered a strain expressing a *Cgfl* promoter-green fluorescent protein (gfp) fusion construct (PCgfl::gfp). We also visualized the development of biotrophic and necrotrophic hyphae in the WT strain by obtaining a transformant expressing a β -tubulin promoter-gfp fusion construct (PCg β -tubulin::gfp) (**Fig. 15b**). Maize leaves were inoculated with both strains and infection sites were observed by confocal microscopy. The PCg β -tubulin::gfp strain fluoresced in both biotrophic and necrotrophic hyphae, enabling the visualization of both structures *in planta* (**Fig. 15b**). At early stages (24 and 48 hpi), no GFP fluorescence was detected in the strain carrying the PCgfl::gfp construct (data not shown); however, fluorescence caused by the activation of the *Cgfl* promoter was observed at 60 hpi, specifically in biotrophic hyphae, the same time point at which *Cgfl* is strongly upregulated *in planta* (**Fig. 15c**). In contrast, no fluorescence was seen in secondary hyphae at 60 hpi or at later time points, such as 96 hpi. To confirm the presence of secondary hyphae in tissues at 60 and 96 hpi, excised infection sites were stained with lactophenol blue. The staining revealed secondary hyphae penetrating the infected epidermal tissue, which is characteristic of typical anthracnose development (**Fig. 15d**), and ensured that infection was progressing normally. From these experiments, we conclude that *Cgfl* is specifically expressed in biotrophic hyphae.

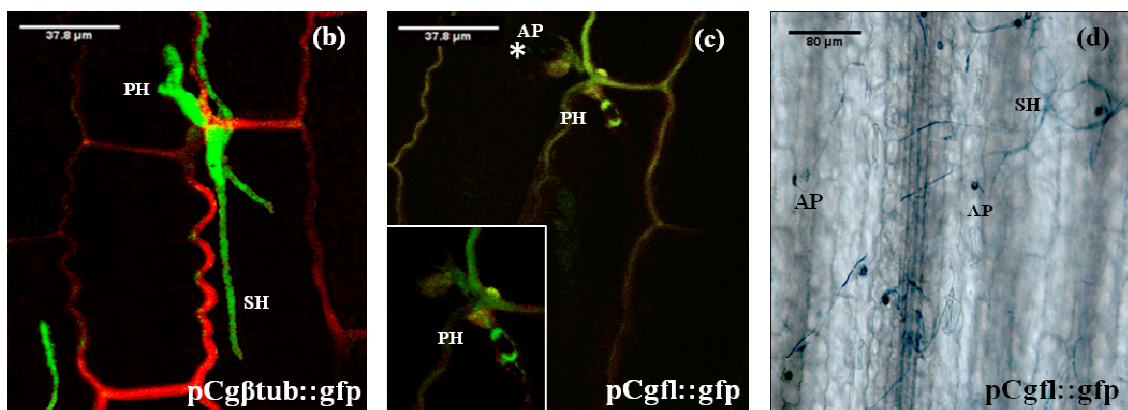


Figure 15. Confocal microscopy images of pCgfl::gfp strain during plant infection. b) Confocal image of a maize leaf infected with the PCg β -tubulin::gfp strain, used to visualize biotrophic and necrotrophic hyphae. **c)** To further study the expression pattern of *Cgfl*, the reporter gene *gfp* was fused to the promoter region of fungalsin (PCgfl::gfp). Fluorescence was only detected in primary hyphae at 60 hpi, when the fungus switches from biotrophic to necrotrophic growth. **d)** Bright field image and lactophenol blue staining denote presence of secondary hyphae in the same site of infection previously observed with confocal microscopy. AP, appressorium; PH, primary (biotrophic) hyphae; SH, secondary (necrotrophic) hyphae.

$\Delta Cgfl$ mutants are severely compromised in virulence on maize leaves and roots.

To characterize the role of *Cgfl* during the infection process, targeted gene deletion mutants were obtained using the DelsGate method (García-Pedrajas *et al.*, 2008a). The native *Cgfl* gene was replaced by the vector pKW1, which contains the *gfp* reporter gene and the hygromycin phosphotransferase gene (*hph*) (Fig. 16a). Approximately 200 transformants were analyzed, two of which contained the expected gene deletion and showed GFP fluorescence, $\Delta Cgfl36$ and $\Delta Cgfl88$ (Fig. 16b). Integration of the deletion construct by homologous recombination, replacing the gene, was confirmed by PCR and Southern Blot analysis (Fig. 16c, d). Growth rate assays and appressorium formation assays showed no statistical differences between the $\Delta Cgfl$ mutants and a *gfp*-tagged version of the WT strain (Sukno *et al.*, 2008b), indicating that these phenotypes are not affected by the loss of *Cgfl*, and further supporting a role for this protein only during the plant-fungus interaction (Fig. 17a, b).

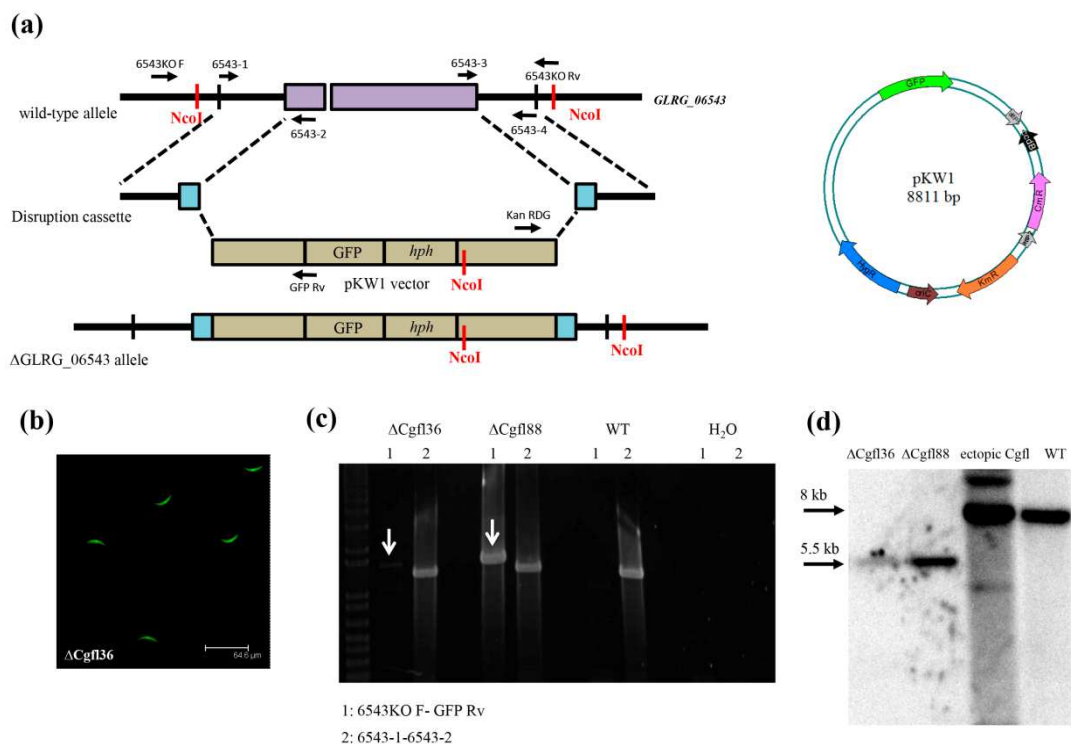


Figure 16. a) Schematic representation of targeted gene replacement using the DelsGate method. pKW1 vector, which is a modified version of pDNOR-A-Hyg and contains a constitutively expressed *gfp* cassette, was used as donor vector. Arrows indicate the primer pairs used to prepare the construct. b) Conidia of the $\Delta Cgfl36$ transformant showing GFP fluorescence. c) PCR of WT and $\Delta Cgfl$ transformants with 6543KO F and GFP R primers. Bands show the replacement of *Cgfl* with the pKW1 vector. d) Southern blot analysis of the WT strain and the $\Delta Cgfl$ transformants. The genomic DNAs were digested with *NcoI* and hybridized with the digoxigenin-labelled 3' *Cgfl* flank probe.

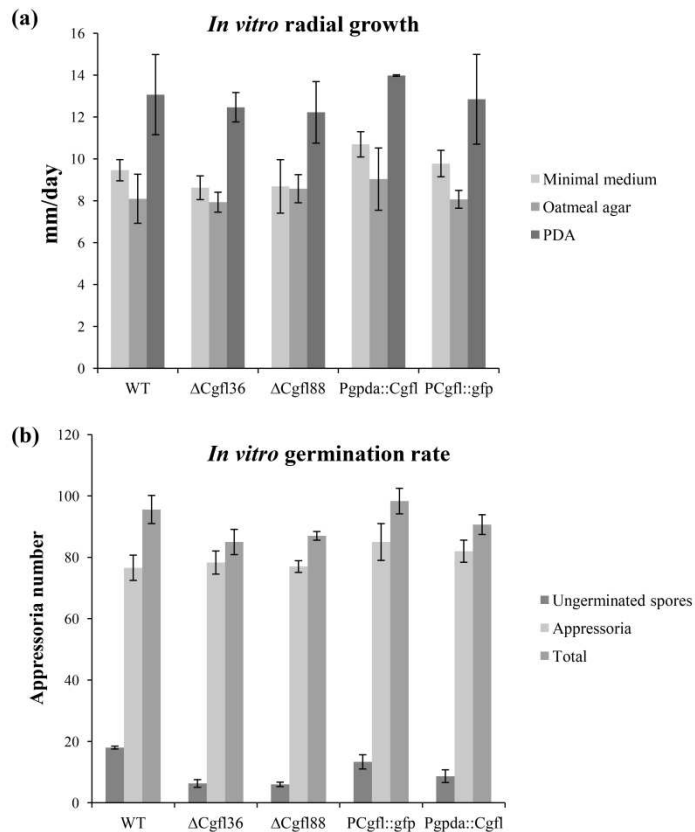


Figure 17. *In vitro* radial growth rate (a) and appressorium formation assays (b) with WT and *Cgfl* transformants.

No difference was observed between the WT and *Cgfl* transformants. Error bars represent \pm SD of three independent replicates.

Maize leaves were inoculated with spore suspensions of WT-GFP, Δ Cgfl36 and Δ Cgfl88 strains (**Fig. 18a**). Control plants were inoculated with water. No differences between inoculations were seen at early points and, at 72 hpi, leaves inoculated by both WT and mutant strains exhibited visible lesions (not shown). At 96 hpi, the necrotic lesions on leaves inoculated with the Δ Cgfl strains were significantly smaller than those on the leaves inoculated with the WT strain (**Fig. 18b**). These results show that *Cgfl* is important for host colonization and disease development.

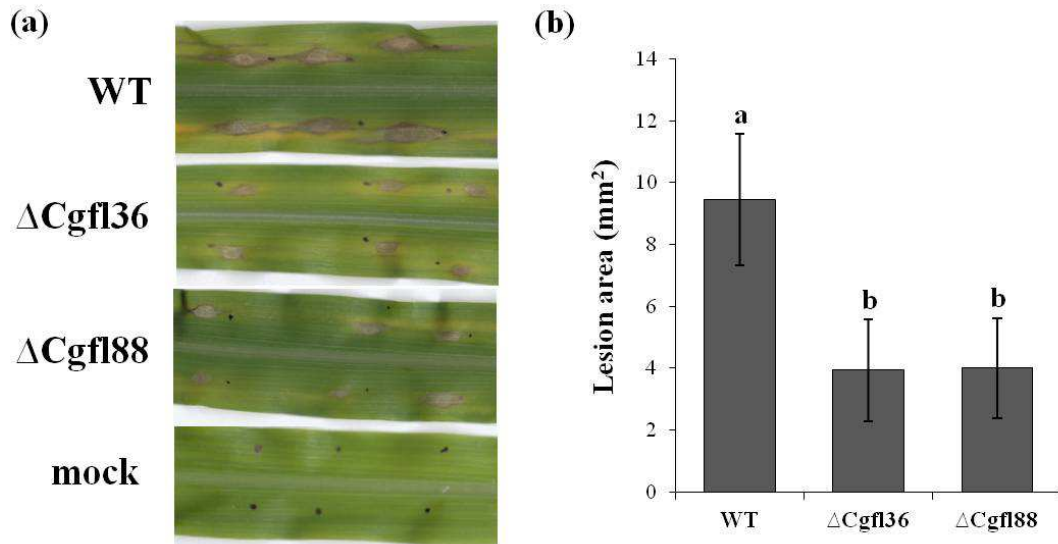


Figure 18. Anthracnose leaf blight assays at 96 hpi performed with WT strain and $\Delta Cgfl$ transformants. a) Lesions on maize leaves at 96 hpi inoculated with spore suspensions of the WT and $\Delta Cgfl$ strains. Two independent transformants are shown. Mock-inoculated leaves were inoculated with water. Disease symptoms were reduced on plants inoculated with the $\Delta Cgfl$ strains. **b)** Mean lesion size was significantly reduced in the $\Delta Cgfl$ strain infections compared with the WT strain. Error bars denote \pm SD. Bars with different letters indicate significant differences according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$). Three independent experiments were performed. Black dots indicate inoculation points.

Fungal infection was monitored by laser scanning confocal microscopy at 24, 48, 60 hpi, which corresponds to the time point of maximum *Cgfl* expression *in planta*, and 96 hpi, when the central zone of the lesions comprises secondary, necrotrophic hyphae. No differences between inoculations were seen at 24 and 48 hpi (data not shown). Both WT and $\Delta Cgfl$ strains contained a constitutively expressed *gfp* construct, enabling us to quantify the differences in tissue colonization by measuring GFP fluorescence at lesion borders and lesion central zones. Examination of the central zone and lesion borders using confocal microscopy showed that at 60 hpi, the infection process proceeded more slowly with the $\Delta Cgfl36$ strain than with the WT strain, indicating that the $\Delta Cgfl36$ strain exhibit reduced ability to colonize maize cells (**Fig. 19a, b, d, e**). The analysis of the fluorescence intensity in images taken at the lesion border and the lesion central zone showed that lesions of the $\Delta Cgfl36$ strain were significantly less fluorescent than those of the WT strain, consistent with reduced colonization of the host tissue (**Fig. 19c, f**). At 96 hpi, there were no significant differences in the levels of fluorescence in the central zones of lesions produced by

the WT and Δ Cgfl36 strain (**Fig. 19g, h, i**). However, the lesion borders still contained significantly reduced numbers of hyphae, based on visual inspection and quantification of fluorescence (**Fig.19j, k, l**). These results suggest that the Δ Cgfl36 strain has a reduced capacity to invade plant tissues during the early stages of colonization, coinciding with the biotrophic stage of development, and at the borders of the lesions which are predominantly comprised of biotrophic hyphae. Necrotrophic development appears not to be impeded in the Δ Cgfl36 transformant.

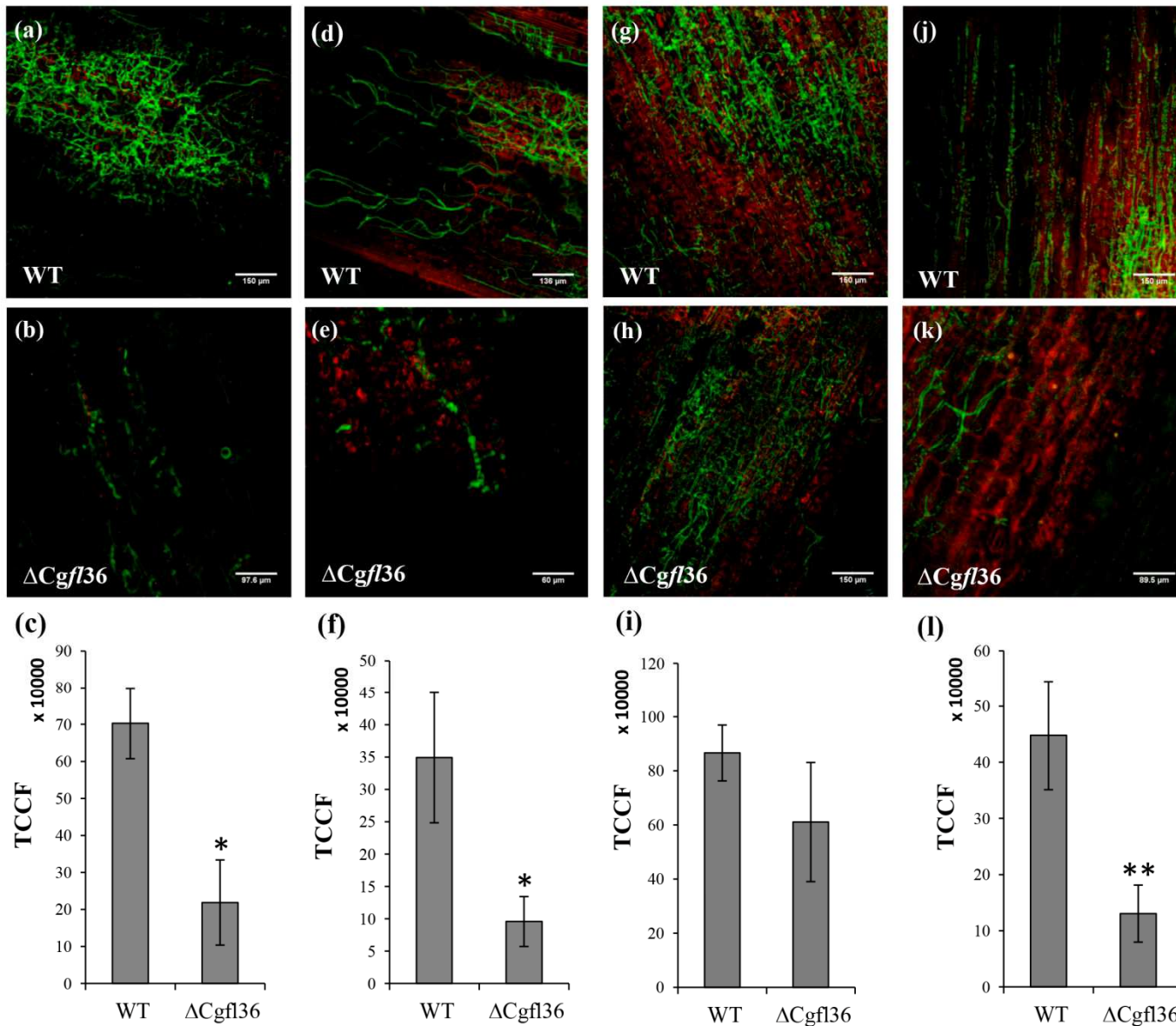


Figure 19. Live cell confocal imaging of maize leaves infected with WT strain and $\Delta Cgfl$ transformants. Fungal infection in maize leaves was monitored by confocal microscopy at 60 hpi and 96 hpi. A detailed examination of the lesions at 60 hpi showed that the infection proceeded more slowly in the $\Delta Cgfl36$ strain relative to the WT strain, indicating that the fungus had reduced ability to colonize host maize cells in the central zone (**a, b**) and in the borders of the lesion (**d, e**) with respect to the WT strain. Differences in fungal growth were quantified by measuring GFP fluorescence (**c, f**) using the ImageJ software. Values shown in the graph represent averages of total corrected cell fluorescence (TCCF) of three independent experiments with SD bars. Asterisk denotes samples that were significantly different from the WT ($P < 0.05$). At 96 hpi, both WT and $\Delta Cgfl36$ strains showed similar growth in the central zone of lesions (**g, h**) but, in the lesion borders, the $\Delta Cgfl36$ mutant exhibits delayed development (**j, k**). Fungal growth was quantified by measuring GFP fluorescence, and TCCF values are represented in graphs **i** and **l**. Double asterisks denote samples that were significantly different from the WT ($P < 0.01$).

We also tested the ability to infect maize roots by performing pathogenicity assays with the WT-GFP and Δ Cgfl36 strains. At 6 dpi, colonization of the epidermis and first cell layers of the cortex by the WT strain was visible (**Fig. 20a**). In contrast, epidermal root cells infected with the Δ Cgfl36 strain showed reduced colonization and, instead, extensive colonization of the exterior of the root (**Fig. 20b**). At 12 dpi, roots infected with the WT strain were extensively colonized by intra- and intercellular hyphae, which extended from the cortex to the endodermis (**Fig. 20d**). By against, roots infected with the Δ Cgfl36 strain showed significantly less colonization of the cortex. The Δ Cgfl36 strain colonized the epidermal layer and cortex, but did not reach the endodermis (**Fig 20e**). Quantification of fluorescence revealed significantly reduced fluorescence at both 6 and 12 dpi (**Fig. 20c, f**). These observations show that Cgfl contributes to virulence in maize roots.

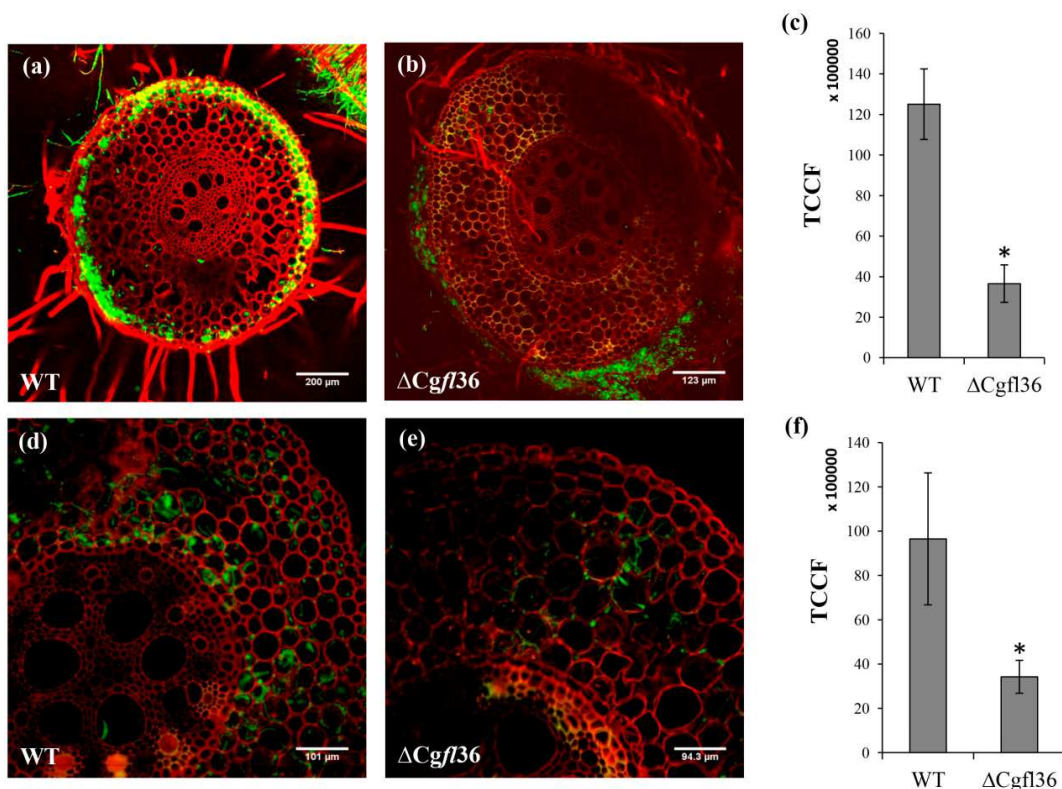


Figure 20. Live cell confocal imaging of inoculated maize roots using WT strain and Δ Cgfl36 transformants. Confocal analysis of the Δ Cgfl36 strain revealed that it showed reduced root colonization relative to the WT strain at 6 and 12 dpi (**a, b, c**). At 6 dpi, Δ Cgfl36 strain remained mostly outside of the root epidermis, whereas WT strain colonized epidermal cells and parts of the cortex (**d, e, f**). At 12 dpi, Δ Cgfl36 strain colonized less root tissue than WT strain. Quantification of the GFP fluorescence signal was made using ImageJ software, and values shown in the graphs are TCCF averages of three independent inoculations \pm SD. Significant differences ($P < 0.05$) between WT and Δ Cgfl36 strains are indicated by asterisks.

We also constructed a strain constitutively expressing *Cgfl* by ligating the *gpda* promoter to the *Cgfl* coding sequence (Pgpda::*Cgfl*). First, we tested *in vitro* several types of liquid media for their capacity to induce *Cgfl* transcription in the WT strain. Maize leaf extract (LE) medium was also used to mimic the plant environment, thereby transcriptionally activating genes that are usually only expressed *in planta* (Krijger *et al.*, 2008). RT-PCR assays confirm that, in the WT strain, *Cgfl* is expressed *in vitro* in LE medium, but not in minimal medium (MM), and that Pgpda::*Cgfl* strain is expressed in both media (**Fig. 22a**). Assays of growth rate and appressorium development showed that Pgpda::*Cgfl* strain is not affected in any of these phenotypes (**Fig. 17**). Pathogenicity assays also failed to detect any differences between the Pgpda::*Cgfl* and the WT strain (**Fig. 21**).

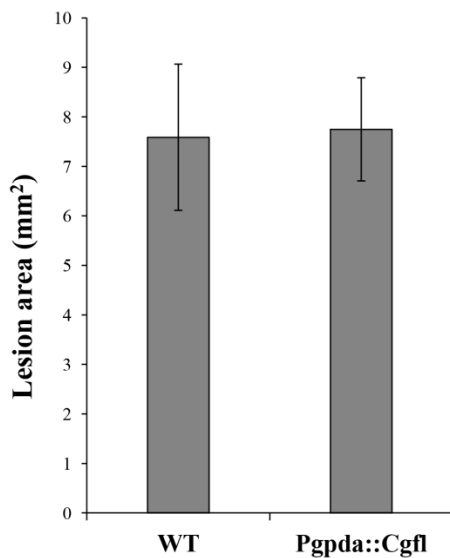


Figure 21. Anthracnose leaf blight assay of the Pgpda::*Cgfl* transformant. No differences in lesion size were seen between maize plants inoculated with the WT strain and the Pgpda::*Cgfl* transformant at 96 hpi. Bars represent means \pm SD based on three independent replicates.

The Δ *Cgfl* mutant shows reduced proteolytic activity

We confirmed the endoproteolytic activity of *Cgfl* using an *in vitro* protease activity assay with WT, Δ *Cgfl*36 and Pgpda::*Cgfl* strains. *Cgfl* transcripts of the WT strain were only detected in LE medium (**Fig. 22a**). Therefore, LE medium was used for protease assays. Fungal strains were grown in LE medium and culture filtrates were tested for their capacity to degrade resorufin casein-labelled, a substrate for detection of endoproteolytic activity. Absorbance of the Δ *Cgfl*36 strain was significantly reduced relative to the WT and Pgpda::*Cgfl* strains, indicating a reduced proteolytic activity in this strain (**Fig. 22b**). To evaluate whether *Cgfl* plays a role in plant chitinase

degradation during the establishment of infection, we performed an *in vitro* chitinase activity assay with protein extracts of infected maize leaves, testing for differences in total chitinase activity present in leaves inoculated with the WT and $\Delta Cgfl$ strains. The artificial substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-N, N', N''- triacetylchitotrioside hydrate was used, which, when cleaved by endochitinases, releases a fluorescent product. Samples from plants inoculated with the $\Delta Cgfl$ strain showed significantly elevated fluorescence, reflecting increased chitinase activity, compared to those inoculated with the WT strain (**Fig. 22c**). No significant differences were observed between the WT and the Pgpda::Cgfl strains. Taken together, these results show that, in absence of Cgfl, maize leaves show increased chitinase activity. This result is consistent with the role of fungalysins in the degradation of chitinases in other fungi (Naumann *et al.*, 2011; Naumann & Wicklow, 2013a; Karimi Jashni *et al.*, 2015).

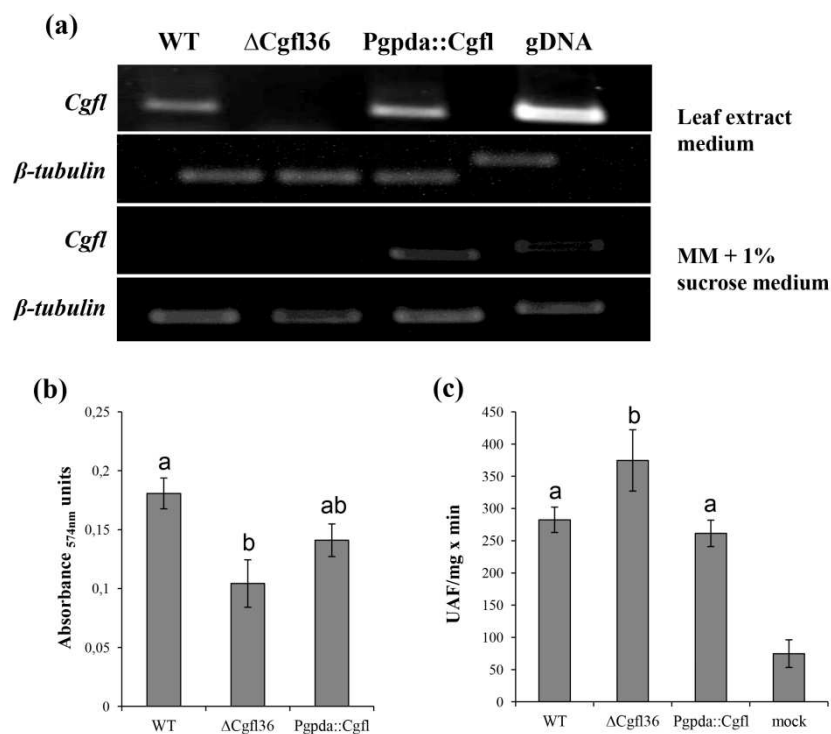
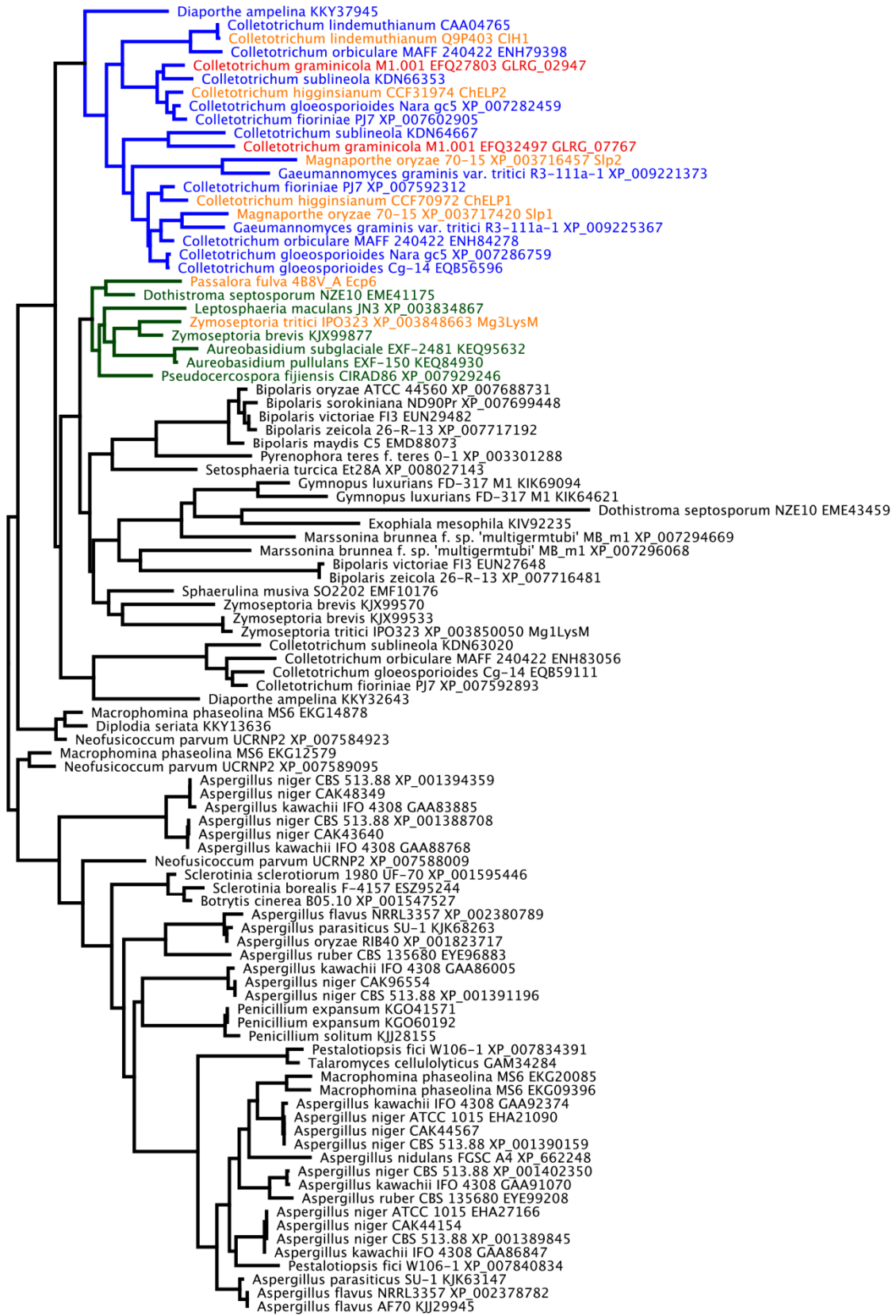


Figure 22. *In vitro* expression, proteolytic and chitinolytic activity assays. **a)** RT-PCR assays showed that *Cgfl* is differentially expressed during *in vitro* cultures. LE medium induced *Cgfl* expression, whereas minimal medium (MM) did not. **b)** Secreted endoproteolytic activity assay revealed reduced absorbance in the $\Delta Cgfl36$ strain with respect to the WT strain in LE medium, in which *Cgfl* is expressed. Two independent experiments were performed with duplicates each time. Error bars represent \pm SD. Bars with different letters differ significantly according to Tukey's HSD analysis at 5% level. **c)** Chitinase activity assay with protein extractions of maize leaves inoculated with WT, $\Delta Cgfl$ and Pgpda::Cgfl strains showed significant differences ($P < 0.05$) according with Tukey's HSD test. Three independent experiments with duplicates each time were performed. UAF, Units of Arbitrary Fluorescence.

The *C. graminicola* genome encodes two Ecp6 homologs

The bioinformatic analysis shows that Cgfl is a fungalysin, a family that is known to degrade chitinases produced by plants. Fungalysins may play a role in the mediation of chitin-triggered immunity (CTI) by degrading the enzymes needed by the plant to activate CTI. Another mechanism by which fungi mediate CTI is through chitin-binding proteins, such as Ecp6 from *Passalora fulva* (*C. fulvum*). Homologs of the gene encoding Ecp6 have been identified in several other plant pathogens, including Slp1 from *M. oryzae* or Mg3LysM from *Z. tritici*. Many species that contain Ecp6 homologs also possess copies of Cgfl, suggesting the presence of two complementary mechanisms for the mediation of CTI. To determine whether *C. graminicola* also contains Ecp6 homologs, we performed a BLAST search using Ecp6 as a query sequence vs. a BLAST database of *C. graminicola* proteins, and identified two proteins with high similarity to Ecp6: GLRG_07767 and GLRG_02947. The structural similarity of the two proteins was analysed using the Phyre2 web server and, in both cases, 90% of the amino acids in both proteins were aligned at over 90% confidence to the Ecp6 structure. We performed another BLAST search, this time using the non-redundant (nr) database and Ecp6 as a query sequence, in order to identify more Ecp6 homologs in other fungi. A phylogenetic analysis of the two *C. graminicola* Ecp6 homologs and the BLAST hits revealed two clades that contain proteins that have been experimentally proven to interact with chitin and that modulate plant immunity (**Fig. 23**). Both *C. graminicola* homologs are within the clade that includes *M. oryzae* Slp1 and Slp2, *C. lindemuthianum* ClH1, and *C. higginsianum* ChELP1 and ChELP2 (Mentlak *et al.*, 2012; Kombrink, 2014).



0.6

Figure 23. Phylogenetic analysis of Ecp6 homologs. The sequences were aligned with MAFFT and a central region containing two LysM motifs (although several proteins have only one motif) was used for construction of the phylogenetic tree using RAxML. Two clades that include proteins that have been experimentally shown to bind chitin and modulate plant immunity are indicated in green and blue. The proteins with experimental evidence to support their function are shown in orange. The two *C. graminicola* homologs are shown in red.

We also performed qRT-PCR experiments to determine whether the Ecp6 homologs are expressed during infection of maize leaves (**Fig. 24**). Both genes show peak expression during the biotrophic stage, after which the expression levels continue to decrease. No transcripts of either gene were detected in *in vitro* cultured mycelium or in ungerminated spores.

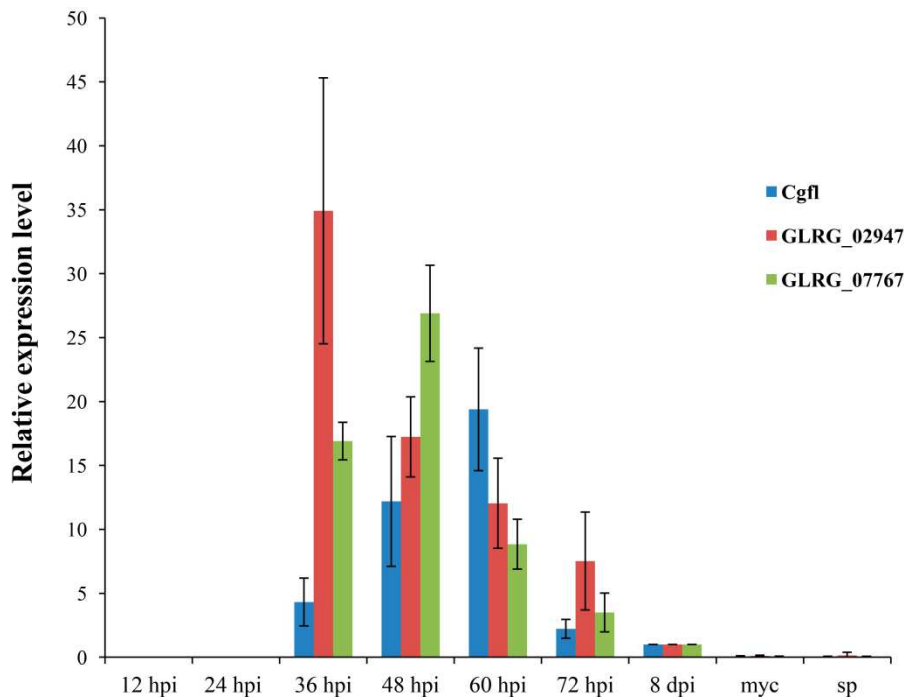


Figure 24. Transcriptional profiles of Ecp6 homologs GLRG_02947 and GLRG_07767 and Cgfl using qRT-PCR. Transcript levels were normalized to the constitutively expressed *C. graminicola* histone *H3* gene. The graph shows the values of two biological replicates with two technical replicates. Error bars denote SD.

Discussion

In recent years, an increasing number of effectors have been identified, but, for many, their biological function and plant targets remain elusive (Oliva *et al.*, 2010; Rafiqi *et al.*, 2012; Stotz *et al.*, 2014). In this work, we describe a fungalysin metalloprotease that plays a role in the virulence and colonization of maize leaves and roots. The biological activity of fungalysins has been demonstrated recently through biochemical analysis in several plant pathogenic fungi, including *C. higginsianum*; they have been shown to specifically degrade chitinases produced by plants, suggesting that they play a role in chitin-mediated plant defence (Naumann *et al.*, 2011; Naumann & Wicklow, 2013a; Karimi Jashni *et al.*, 2015). The *C. graminicola* Cgfl protein represents another mechanism by which fungi control chitin-mediated activation of plant defenses.

We have shown that fungalysins are highly conserved enzymes, and are present in most fungi. Most members of the Sordariomycetes have a single fungalysin gene, although some species carry two copies, which may have arisen through an ancient gene duplication event or through horizontal gene transfer. Vertebrate pathogens of the Onygenales, an order of dermatophytic fungi, have duplications of genes encoding fungalysins, and it has been proposed that these gene family expansions play a role in host specialization (Jousson *et al.*, 2004; Li & Zhang, 2014). The same may be true in plant pathogens, and we hypothesize that, in those species with gene duplications, both copies have roles in pathogenesis. Our phylogenetic analysis also revealed that some members of the Sordariomycetes lack a fungalysin gene, including a lineage that contains species that are typically regarded as saprophytes, suggesting that a loss of the fungalysin gene may be associated with a loss of pathogenicity. The plant pathogens within the Sordariomycetes have a variety of lifestyles, including those that specialize in colonizing above-ground plant parts and those that specialize in the colonization of roots. This suggests that fungalysins are important for fungi with a diversity of different pathogenic lifestyles.

Previous studies have revealed that *C. graminicola* effector gene expression is highly dynamic and is induced in successive waves during specific stages of the infection process (O'Connell *et al.*, 2012). During the biotrophic phase, transcriptional profiling has revealed that secondary metabolites and effector proteins are preferentially secreted in order to establish and facilitate host infection, while CAZymes, proteases and transporters are expressed at the switch to the necrotrophic stage. Previously, we have identified a fungalysin in *C. graminicola* that is strongly up-regulated during the early stages of infection (Vargas *et al.*, 2012). Genome-wide expression profiling by RNA-Seq also revealed that *Cgfl* is up-regulated during the biotrophic phase and is among the 100 most highly expressed genes induced in biotrophy (O'Connell *et al.*, 2012). In this study, biotrophy-associated gene expression was confirmed by qRT-PCR and live cell imaging of a WT strain carrying a *Cgfl* promoter-*gfp* fusion, indicating that it is specifically expressed in biotrophic hyphae during the late biotrophic phase of the infection process. This highly modulated pattern of expression is consistent with other effectors and suggests that *Cgfl* is not needed during necrotrophic growth.

Interestingly, constitutive expression of *Cgfl* has no effect on virulence or any of the other studied phenotypes. Several cases have been reported in the literature in which the constitutive expression of defence-associated genes had no effect on pathogenicity or other phenotypes (Baeza-Montañez *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). It is well known that transcript abundance levels may be not correlated with protein levels and/or enzymatic activity because of the regulation of the translation, protein post-translational modifications or turnover (Yang *et al.*, 2013; Baeza-Montañez *et al.*, 2014). Thus, it is possible that, even though the gene is constitutively expressed, the protein is not present or is not in a mature and fully functional state. Alternatively, if *Cgfl* specifically targets one or a few plant chitinases, its expression in conditions and at time points at which the chitinases are not present would not result in a change in phenotype. Future studies aimed at the study of maize chitinase expression during the infection process may reveal whether *Cgfl* is expressed specifically and only when maize chitinases are present.

Recently, we have performed a genome-wide survey of natural selection acting on protein coding and non-coding DNA sequences in *C. graminicola* (Rech *et al.*, 2014). The fungalysin-encoding gene *Cgfl* was among a group of genes for which there is evidence for positive selection in the 3'-untranslated region (UTR) and downstream region of the gene. There is increasing evidence that this region of the gene plays an important role in gene transcriptional regulation. We speculate that there may be strong selective pressure for the fungus to modulate the expression of *Cgfl* to coincide with the expression and secretion of the plant's chitinases.

To validate the role of *Cgfl* during pathogenesis, we developed *C. graminicola* null mutants lacking the *Cgfl* gene and tested their ability to infect maize leaves and roots. Infection assays on maize leaves with *Cgfl* null mutants showed that *Cgfl* is required for full virulence on maize plants. Confocal microscopic analysis revealed that $\Delta Cgfl$ mutants, during the early stages of infection and later at lesion margins, which mainly comprise primary hyphae, show reduced capacity to proliferate through leaf tissue. These results reinforce the idea that *Cgfl* suppresses the host immune system during the biotrophic phase of the infection and that it has no role during necrotrophic growth. Infection assays carried out on maize roots showed that the $\Delta Cgfl$ mutants had reduced capacity to colonize the cortex, revealing that *Cgfl* also plays a role in chitin-mediated signaling in roots. In *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Karimi Jashni *et al.* (2015) found that a null mutant of a fungalysin (FoMep1) had no effect on virulence; however, when both FoMep1 and a serine protease (FoSep1) were deleted in the same strain, a reduction in virulence was observed. As the $\Delta Cgfl$ mutants show a clear phenotype in *C. graminicola*, we conclude that fungalysin-mediated chitinase degradation plays a more important role in the virulence of *C. graminicola* than in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. However, the *C. graminicola* genome encodes two serine proteases with high similarity to FoSep1, so we cannot discount the possibility that they may also contribute to chitinase degradation.

Many fungi that interact with plants secrete proteins that contain LysM motifs, which enable the proteins to interact with, and sequester, chitin molecules, or to protect chitin from degradation by plant hydrolytic enzymes (Kombrink *et al.*, 2011; Gust *et al.*, 2012). Several fungal effectors of *C. fulvum* have been reported to interfere

with chitin perception (Bolton *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2010). Interestingly, LysM effectors are not restricted to *C. fulvum*, and orthologs can be found in a wide range of fungal pathogens (Bolton *et al.*, 2008; Stergiopoulos *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012) including *Colletotrichum spp.* such as *C. lindemuthianum* (Takahara *et al.*, 2009), *C. higginsianum* and *C. graminicola* (O'Connell *et al.*, 2012). One of these genes, Ecp6, has been shown to be important in virulence in *C. fulvum* (Bolton *et al.*, 2008) by sequestering chitin oligomers and preventing chitin-triggered M/PTI in plants (de Jonge *et al.*, 2011). Homologs of Ecp6 have been identified in *Z. tritici*, *M. oryzae*, *C. lindemuthianum* and *C. higginsianum*. Some of these species carry two Ecp6 homologs, but, in each case, at least one of the copies has been demonstrated to suppress chitin-induced M/PTI (Marshall *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012). The *C. graminicola* genome encodes two genes (GLRG_02947 and GLRG_07767) with homology to Ecp6. The similarities in domain structure, phylogenetic relationships and gene expression patterns are all consistent with the hypothesis that these two *C. graminicola* genes have functions similar to Ecp6. Both genes are expressed specifically during the infection process and have a peak of expression at 36 hpi and 48 hpi, respectively, before the expression peak of *Cgfl*, suggesting that *C. graminicola* employs both strategies to control CTI, but not at the same time. Like Ecp6, fungalysins are broadly distributed in the fungi but, unlike Ecp6, the fungalysins have highly conserved amino acid sequences, suggesting that their functions have remained essentially unchanged despite hundreds of millions of years of evolution in distinct fungal lineages. We propose that fungalysins are an ancient mechanism by which fungi control CTI and that this mechanism is present in a wide diversity of fungi that interact with plants.

In *Z. tritici*, evidence of positive Darwinian selection was detected in Ecp6 homologs (Marshall *et al.*, 2011). Interestingly, our previous genome-wide survey of selection in *C. graminicola* did not detect positive selection in the coding sequence of these genes. Instead, we found evidence of positive selection in the flanking non-coding parts of the gene, suggesting selection for the transcriptional profile (Rech *et al.*, 2014).

The arms race model is often used to describe the evolution of plant-fungal interactions. Chitin signaling is a good example of the evolution of plant-fungal cross-

talk. Chitin is a key component of fungal cell walls and plants have evolved receptors to detect it and activate plant defenses. One of these defenses is the production of chitinases, which degrade the fungal cell wall, releasing chitin monomers that improve the plant's ability to detect the presence of fungi. Chitinases therefore represent an evolutionarily conserved mechanism to degrade fungal cell walls and aid in their detection. Fungi have evolved several mechanisms to mitigate the chitin-mediated defence responses. One of these is chitin deacetylation, converting chitin to chitosan, which has a significantly reduced capacity relative to chitin to elicit a response (Vander *et al.*, 1998; El Gueddari *et al.*, 2002) . Fungi also secrete chitin-binding proteins to protect themselves from chitin-mediated activation of the plant immune system. In addition, fungi have evolved proteases, such as fungalysin, which degrade chitinases directly. Recently, a further step in this model of plant-pathogen co-evolutionary competition has been described. Hevein-like antimicrobial peptides that block fungalysin activity have been described in wheat (Slavokhotova *et al.*, 2014).

Our discovery of the precise transcriptional regulation of *Cgfl* during the first hours of infection and our subsequent demonstration of its importance in virulence demonstrates that secreted proteases represent an important class of effectors that target specific proteins involved in the plant immune system. In conclusion, this work supports the hypothesis that *Cgfl* is a fungalysin metalloprotease, which is important during the establishment of infection and contributes to virulence. This protein is highly conserved among fungi, suggesting that chitinase degradation is a characteristic of many fungal species. Fungalysin-mediated degradation of chitinases is another mechanism by which fungi may attenuate chitin-mediated activation of the plant's immune system.

Materials and methods

Phylogenetic analysis

To identify homologs of GLRG_06543, we performed a BLAST search against the complete fungal proteomes available in UniProt (www.uniprot.org), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Joint Genome Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) and Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>) databases. The homologous proteins were aligned with MAFFT (Kato *et al.*, 2002a). MODELGENERATOR (Keane *et al.*, 2006) was used to identify the best-fitting substitution model and PhyML (Guindon *et al.*, 2010) to reconstruct the phylogeny. A bootstrap test with 100 replicates was also performed with PhyML. The sequence alignments and phylogenetic analysis were performed with Geneious (<http://www.geneious.com>).

The complete proteomes of the selected species were analysed with Mirlo (<https://github.com/mthon/mirlo>) to identify conserved single-copy protein families. Five protein families were aligned with MAFFT and then the alignments were concatenated. The phylogenetic tree was constructed using PhyML.

Homologs of *Passalora fulva* Ecp6 were identified by performing a BLASTP search to the nr database. The top 100 hits to members of the Fungi were kept for the analysis. The proteins were reviewed to remove duplicate sequences and then were aligned with MAFFT. The alignment was edited to remove the highly variable parts of the sequences, leaving only two conserved LysM domains. The phylogenetic tree was constructed with RAxML using the GAMMA JTT substitution model. The BLAST search, alignment and other operations were completed using Geneious.

Prediction of the fungalsin structure and interaction model

The signal peptide and cleavage site were identified with SignalP (Petersen *et al.*, 2011). InterProScan was used to identify the protein domains. The three-dimensional structures of Cgfl and *Z. mays* class IV chitinase ACX37090.1 were constructed using

the Phyre 2 server (Kelley & Sternberg, 2009). We manipulated the three-dimensional models with PyMOL (Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC, München, Germany).

Fungal strains and culture conditions

Colletotrichum graminicola M1.001 BH (WT) strain, and its derivative GFP-tagged strain, M1.001 BH-GFP (WT-GFP) (Sukno *et al.*, 2008b) were used. Cultures were maintained as described previously (Sukno *et al.*, 2008b) and grown in solid medium, i.e. potato dextrose agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), minimal medium or oatmeal agar (Difco). To prepare vegetative mycelium, cultures were grown in potato dextrose broth (PDB) (Difco), LE medium (Krijger *et al.*, 2008) or minimal medium supplemented with 1% sucrose, and incubated at 25°C and 180 rpm. *In vitro* growth rate assays and *in vitro* appressorium formation rate assays were performed as described previously (Thon *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002).

Pathogenicity assays

In vivo leaf blight assays were performed using the susceptible maize inbred line Mo940 (Warren *et al.*, 1975) as described previously (Vargas *et al.*, 2012). Infected leaves were excised from the plant, scanned using a flat-bed scanner and lesion areas were measured using the imaging processing software Paint.NET. Differences among average lesion sizes were tested using a completely randomized analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD test. Maize root infection assays were performed as described previously (Sukno *et al.*, 2008b). Fluorescence intensities were quantified using the ImageJ software. Three independent experiments were performed and in each experiment, four images were used to calculate the total corrected cellular fluorescence (TCCF). TCCF was calculated using the formula: TCCF = Integrated Density - (area of selection x mean fluorescence of backgrounds readings).

Gene deletion

The *Cgfl* gene deletion construct was prepared using the DelsGate System (García-Pedrajas *et al.*, 2008a). The 5' and 3' regions flanking the GLRG_06543 coding sequence were amplified by PCR using the primer pairs 6543-1- 6543-2 and 6543-3 - 6543-4. The pKW1 vector, which contains a *gfp* cassette and a hygromycin B phosphotransferase cassette (*hph*), was used as the pDONR vector for cloning the *Cgfl* flanking regions using Gateway technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) The construct was confirmed by sequencing, linearized by enzymatic digestion with *SceI* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and transformed into *C. graminicola* M1.001 as previously described (Thon *et al.*, 2000; Sukno *et al.*, 2008b). Transformants containing the desired gene deletion were identified by PCR amplification of the internal region using two sets of primers (**Table 2, see Supporting Information**).

Genomic DNA extraction and Southern blot analysis

Genomic DNA (gDNA) was extracted from mycelium using the protocol adapted from (Baek & Kenerley, 1998a). For Southern Blot analysis, 10 µg of gDNA were digested with *NcoI* (Roche Diagnostics), separated in 0.8% (w/v) agarose gel, denatured and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham HyBond-N, GE-HealthCare, Little Chalfont, UK). A digoxigenin (DIG) dUTP-labelled probe (the 3' flanking region of the *Cgfl* coding sequence) was generated by PCR using a DIG DNA labelling kit (Roche Diagnostics) and primers 6543-3 and 6543-4, and *C. graminicola* M1.001 gDNA as template. The membranes were hybridized and washed under high-stringency as described by Sambrook and Russell (2001).

RNA extraction and qRT-PCR assays

Total RNA was purified from liquid cultures as previously described (Vargas *et al.*, 2012). To confirm the absence of gDNA, RT-PCR and qRT-PCR assays were performed without reverse transcriptase. qRT-PCR was carried out using a KAPA SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), and 1 µL of the reverse transcription reaction. Amplifications were performed in a StepOnePlus™ Real-Time

PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the following program: 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 30 sec. The accuracy of the SYBR-Green detection was verified by checking the melting curves for the presence of only one specific peak. The PCR product size was checked by electrophoresis in 2.5% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. Samples were collected from three different plant infection assays and an independent set of cDNAs was prepared for each biological replicate. Gene-specific primers used in qRT-PCR reactions are listed in **Table 2 (see Supporting Information)**. All primer pairs showed efficiencies greater than 95%. The relative transcript abundance was normalized using the reference gene histone *H3* (Krijger et al., 2008), whose expression was confirmed to be stable in all of the conditions tested. Relative expression levels were calculated using the comparative Ct method (Livak et al., 1995) All Ct calculations and statistical analyses were performed using the StepOne™ software V2.2.2.

Secreted endoprotease activity assays

Liquid fungal cultures were grown at 25°C and 150 rpm for 4 days in different media (PDB medium, Fries medium, minimal medium supplemented with 1% sucrose, or maize LE medium). To minimize the effect of endogenous proteases that are present in LEs, the medium was previously heated to 65°C for 5 minutes (Sambrook & Russell, 2001). Supernatants were recovered by filtration through miracloth and mycelia were frozen in liquid nitrogen and used for RT-PCR assays. Resorufin-labelled casein (Roche Diagnostics) was used for the detection of proteolytic activity following the protocol of Jousson et al. (2004). Blanks were made with substrate and without culture supernatants. The experiments were performed two times and in duplicate each time. The results were tested with a one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

Total chitinase activity assay

Densely inoculated maize leaves were collected at 60 hpi and frozen in liquid nitrogen. Proteins were extracted according to (Lange *et al.*, 1996). 4-methylumbelliferyl- β -D-N, N',N''-triacetylchitotrioside hydrate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an artificial substrate (Ren *et al.*, 2000). Maize protein extracts were incubated with the substrate and sodium acetate buffer (50 mM pH 5.0) for 1 hour at 37°C, and the reaction was stopped with 0.1M NaOH. Fluorescence was measured in a Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) with an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm. One unit of activity was defined as a change in the fluorescence of five absorbance units per minute. The protein concentration was measured according to the method of Bradford with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Construction of the *PCgfl::gfp* transcriptional fusion

To construct the *PCgfl::gfp* transcriptional fusion, the *Cgfl* gene promoter was predicted to be 1.4 kb upstream of the *Cgfl* start codon. Primers 6543FTr Fw and 6543FTr Rv (**Table 2**) were designed to amplify this region from gDNA. The fragment was cloned using the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen), confirmed by sequencing and recombined into the pKW3 destination vector, which contains a *gfp* cassette (Vargas *et al.*, 2016). The construct was confirmed by sequencing, and *PCgfl::gfp* transformants were confirmed by PCR with primers 6543FTr Fw and GFP Rv. A construct fusing the β -*tubulin* promoter to the *gfp* coding sequence was prepared to visualize the WT strain infection process.

A strain constitutively expressing *Cgfl* was obtained by amplifying the *Cgfl* coding sequence with primers 6543OE Fw and 6543OE Rv and ligated in frame into the pRF-HUE vector, containing the *gpdA* promoter, by the USER Friendly cloning reaction (Frandsen *et al.*, 2008). The resulting vector was transformed into *C. graminicola* M1.001 protoplasts, and transformants with ectopic integrations of the plasmid were selected. The construct and transformants were confirmed by PCR using primers *gpdA* Seq F1 and 6543OE Rv.

Microscopy and image processing

Confocal images were taken on a TCS/SP2 Leica Laser Scanning spectral confocal microscope (Leica, Bensheim, Germany), using an argon laser at 488 nm, and GFP fluorescence was detected at 490-520 nm. A range of 595-680 nm was used to eliminate plant autofluorescence. For fluorescence and bright field microscopy, a Leica DMLB fluorescence microscope, a Leica DG300F digital camera and Leica IM1000 software was used. Projections were generated from adjusted individual channels in the image stacks using Leica Confocal Software.

Supplementary Material

Table 2. Primers used in this study.

Primer name	Sequence 5'-3'	Description	Reference
6543-1	TAGGGATAACAGGGTAATCCTTGAGGCGAGTGGACGCC	GLRG_06543 deletion cassette	This article
6543-2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATGCGGGATG GAAGGCGAGGA	GLRG_06543 deletion cassette	This article
6543-3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGTCCCCGCT GGTGTTTGCT	GLRG_06543 deletion cassette	This article
6543-4	ATTACCCTGTTATCCCTAGTGCCCAGCAGCCGTCACCT	GLRG_06543 deletion cassette	This article
6543KORvC	CCGCAAGCTGTGGGTGGCT	Confirmation of deleted clones	This article
Kan RDG	ATCGCGGCTCGACGTTTCC	Confirmation of deleted clones	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
6543FTr Fw	CACCCCTTGAGGCGAGTGGACGCC	GLRG_6543 transcriptional fusion	This article
6543FTr Rv	TGCGGGATGGAAGGCGAGGA	GLRG_6543 transcriptional fusion	This article
TubFus1	CCCCTACTCAAGACAGGTGGT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	This article
TubFus2	CACCAGCTTCTGCCCCACGGTTAT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	This article
GFP Rv	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	Confirmation of transcriptional fusion	This article
gpdA Seq F1	GTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGT	Sequencing from gpdA	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
gpdA Seq F2	TCCCACTTCATCGCAGCTTGA	Sequencing from gpdA	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
6543 OE Fw	GGACTTAAUAGGCACTTACCAGTCCCCCGTT	GLRG_06543 overexpression	This article
6543 OE Rv	GGGTTTAAUTCCTCGCTTACCACCCCTCA	GLRG_06543 overexpression	This article

Ctub Fw	CAGTCCCTTGGGCGGCACAG	<i>C. graminicola</i> β -tubuline RT-PCR	(Vargas et al., 2016)
Ctub Rv	CCCGGGGCAATTGACGCC	<i>C. graminicola</i> β -tubuline RT-PCR	(Vargas et al., 2016)
6543RT Fw	ACGTCGAAACGGCCACGGAG	GLRG_06543 RT-PCR	This article
6543RT Rv	CGCCACGAGAGGGCGAGAGA	GLRG_06543 RT-PCR	This article
CgH3qPCR F	CGAGATCCGTCGCTACCAGA	qPCR <i>C. graminicola</i> <i>Histone 3</i>	(Krijger et al., 2008)
CgH3qPCR R	GGAGGTCGGACTTGAAGTCCT	qPCR <i>C. graminicola</i> <i>Histone 3</i>	(Krijger et al., 2008)
FLqPCR F	CTGCTTCTCCCTTGACCTGG	qPCR GLRG_06543	This article
FLqPCR R	AGCTCGCAACTTCGACTACC	qPCR GLRG_06543	This article
2947qPCR F	CGGCCTTAACCTTGGTCTTGTGCA	qPCR GLRG_02947	This article
2947qPCR R	GGTTCCATTATCGCCGTCCTTGC	qPCR GLRG_02947	This article
7767qPCR F	GGTCGCTGAGGTTGTTGAGCAAAG	qPCR GLRG_07767	This article
7767qPCR R	CTTTTCTCCATCCTCGCCGCC	qPCR GLRG_07767	This article

CHAPTER II

**A plant gene acquired by fungi aids
in virulence**

Abstract

Colletotrichum graminicola is an ascomycete fungus that causes maize anthracnose, one of the most devastating maize diseases worldwide. Previously, our group discovered a subtilisin-like serine protease encoding gene named *Colletotrichum* plant-like subtilisin (*CPLS*) that was acquired by *Colletotrichum spp.* from plants through horizontal gene transfer (HGT). New phylogenetic analyses have revealed that *CPLS* homologs are present in all members of the genus *Colletotrichum* and in only one other fungal genus, *Diaporthe*. *In vivo CPLS* expression analyses using qRT-PCR and transcriptional fusions with the *CPLS* promoter and *GFP* showed that *CPLS* is expressed during the early stages of infection, reaching a maximum gene expression at 48 hours post-infection. To understand the role of the protein in virulence, we obtained *CPLS* null mutants by gene replacement. Foliar pathogenicity assays show that the null mutant is hypervirulent but accumulates less fungal biomass during colonization of host tissues. In contrast, no differences between the *CPLS* null mutant and wild-type strain were seen during root infection assays indicating that the role of *CPLS* in virulence is tissue specific. We also measured the expression of two CC-NLR immune receptors involved in plant cell death during infection. We found that both genes were suppressed during the biotrophic stage of infection. However, in plants infected with the *CPLS* null strain, both genes were up-regulated at early and late time points of infection. Thus, we confirmed that *CPLS* is a conserved effector in *Colletotrichum* that modulates the host immune response, specifically in maize leaves.

Introduction

Plant diseases are the principal cause of yield losses in agricultural crop production (Cuming, 2009; Flood, 2010). Anthracnose, caused by members of the fungal genus *Colletotrichum*, are a devastating group of plant pathogens, infecting nearly every agriculturally important crop (Bailey & Jeger, 1978; Perfect *et al.*, 1999; Bergstrom & Nicholson, 1999). *Colletotrichum graminicola* causes maize (*Zea mays*) anthracnose, increasingly recognized as presenting a worldwide threat to food security (Munkvold, 2002; Fisher *et al.*, 2012; Kamenidou *et al.*, 2013; Sanz-Martín *et al.*, 2016b). Furthermore, *C. graminicola* is a model organism for the study of hemibiotrophs. These pathogens infect their hosts as biotrophs, without killing the host cells, and eventually switch to a necrotrophic lifestyle, killing and feeding on dead host tissues (Bergstrom & Nicholson, 1999; O'Connell *et al.*, 2012). Thus, understanding its infection strategy and the determinants responsible for pathogenicity is therefore important to develop anthracnose disease management procedures.

Plants and pathogens are in a continuous evolutionary battle. To detect and avoid pathogen invasion, plants have evolved sophisticated defense mechanisms including physical barriers, antimicrobial compounds and an innate immune system. The first layer of the plant immune system is PAMP-triggered immunity (PTI), which is based on the sensitive perception of broad pathogen or microbe associated molecular patterns (P/MAMPs) (Jones & Dangl, 2006; Pel & Pieterse, 2013). Plant pathogenic fungi secrete effectors into the host cytoplasm or apoplast. They act as key elements during the infection process and are involved in the suppression or evasion of plant defense responses and programmed cell death (PCD), and in the manipulation of the plant's metabolism to their benefit (Hogenhout *et al.*, 2009; Dodds & Rathjen, 2010; Giraldo & Valent, 2013). Plants rely on effector-triggered immunity (ETI), which perceives effectors produced by pathogens that have evolved the ability to suppress PTI and elicit effector-triggered susceptibility (ETS). This second layer employs intracellular immune receptors, most of which are nucleotide-binding site leucine-rich repeat containing (NLR) proteins, which recognize pathogen effectors or effector activity. Plant NLR disease resistance proteins are divided into two major classes defined by the

presence of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) or coiled-coil (CC) motifs on their N-terminal domains (McHale *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2014). Furthermore, they are some of the largest proteins known in plants and are ancient in origin. In fact, NLR-encoding genes are frequently clustered in the genome, the result of both segmental and tandem duplications (Meyers *et al.*, 2003; Leister, 2004). Specific recognition of pathogen effectors leads to activation of these NLR proteins triggering a strong immune response. Thus, plant resistance is often associated with a localized programmed cell death termed the hypersensitive response (HR) (Jones & Dangl, 2006).

Subtilisin-like serine proteases are commonly found in Archaea, Bacteria and Eukarya (Rawlings & Barrett, 1993). In plants, they play active roles in plant-pathogen interactions and trigger several plant immune responses such as PCD and induction of priming (Figueiredo *et al.*, 2014). The *Arabidopsis* subtilisin SBT3.3 plays a signaling role in establishing plant immune priming, activating chromatin remodeling and defence genes (Ramírez *et al.*, 2013). In addition, the tomato subtilisin P69C is described as a pathogenesis related (PR) protein because it accumulates in leaves after infection with citrus exocortis viroid (CEV) (Granell *et al.*, 1987) and *Phytophthora infestans* (Christ & Mössinger, 1989). P69C degrades a leucine-rich repeat protein (LRP), an extracellular protein of unknown function and the first subtilisin substrate identified in plants (Tornero *et al.*, 1996a). Although plants have no genes orthologous to caspases, it has been demonstrated that PCD in plants is regulated by caspase-like proteases, and some of them have been isolated and identified as subtilisin-like serine proteases (Coffeen & Wolpert, 2004; Chichkova *et al.*, 2010, 2012; Vartapetian *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2015).

Previously, we discovered a S8A subtilisin-like serine protease that was horizontally transferred from plants to an ancestor of the genus *Colletotrichum* (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a,b). We named this gene *CPLS* (*Colletotrichum* plant-like subtilisin) because of its similarity to plant subtilisins and its structural and phylogenetic differences to vertically inherited subtilisins in the *Colletotrichum* genome. In addition to phylogenetic analyses, domain content and tertiary structure of *CPLS* both support its origin as a plant gene that was transferred horizontally to fungi. Plant S8A subtilisins

contain the inhibitor I9 domain (PF05922), the PA domain (PF02225) and the peptidase S8 domain (PF00082), as does CPLS. In contrast, fungal subtilisins rarely have both the I9 and PA domains together in the same protein, further suggesting that the gene was acquired by HGT (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a). Three-dimensional structure modelling also showed that CPLS is much more similar to plant subtilisins than to other fungal subtilisins. Gene expression analysis showed that the *CPLS* is modulated during the infection of maize by *C. graminicola* suggesting that it has a role in plant disease (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a). Based on the known roles of proteases in plant pathogenic fungi and the gene expression patterns, we postulated that CPLS has an important role in plant infection, possibly functioning as an effector.

In this study, we characterized the function of CPLS and studied its role in modulating the transcription of host genes. Our results indicate that *CPLS* is a conserved effector in *Colletotrichum* directly involved in pathogenicity and plays an important role in the modulation of host immunity. We show that *CPLS* provides a fitness benefit by enabling *Colletotrichum* to suppress the early immune response and permitting greater infectious growth in maize leaves.

Results

CPLS encoding genes are present in both *Colletotrichum* and *Diaporthe* spp. but absent in all other fungi

The BLAST searches and phylogenetic analyses revealed that all members of the genus *Colletotrichum* (14 species with draft genome sequences were available at the time of this analysis) have at least one CPLS homolog and several species contain two copies (**Figure 25**). We detected two CPLS homologs in three species, including *C. gloeosporioides* confirming our previous report (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013b). In addition, both *C. orbiculare* and *C. fruticola* contain two CPLS encoding genes. We found CPLS homologs in only one other fungal genus, *Diaporthe* and all four *Diaporthe* spp. genomes examined have one copy of the gene. Since both genera are members of

the Sordariomycetes and are relatively closely related, it is probable that the HGT event occurred in a common ancestor of both genera. CPLS homologs are present in all seven *C. graminicola* isolates, reported by Rech *et al.* (Rech *et al.*, 2014). Interestingly, a re-examination of the data of Rech *et al.* shows that there is evidence of positive selection in the 3' downstream region of the gene (500 bp downstream the transcription stop codon), suggesting that there has been selection for mutations that affect the transcription of the gene, instead of the protein sequence.

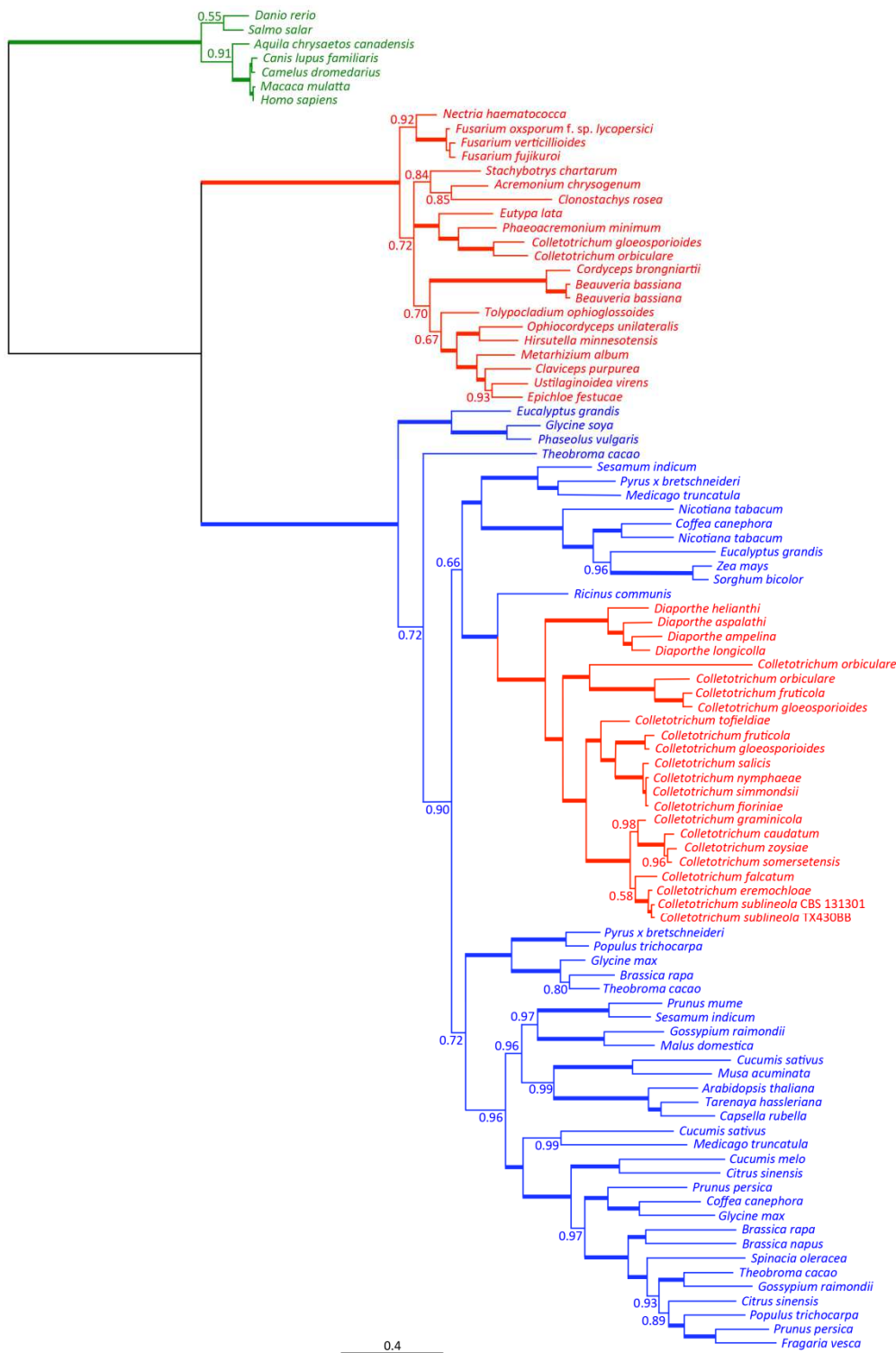


Figure 25. Phylogenetic analysis of CPLS homologs. The tree was constructed using Bayesian MCMC analysis of an alignment of the amino acid sequences reported in **Supplementary Table 1**. The thick branches represent Bayesian posterior probability (BPP) values of 1.0. Branches with BPP less than 1 are shown. Colors of branches indicate the kingdom of the organisms analyzed: blue for Animalia, green for Viridiplantae and red for Fungi.

***CPLS* is primarily expressed during the biotrophic stage of *C. graminicola* development in maize**

To study the expression of *CPLS* during the different stages of maize infection by *C. graminicola* and in mycelium and conidia cultured *in vitro*, we performed a quantitative real time PCR (qRT-PCR) assay. Maize anthracnose begins with a biotrophic phase which lasts for approximately 48 hours, during which time the fungus produces voluminous primary hyphae without disrupting the host plasma membrane. Subsequently, *C. graminicola* begins to form necrotrophic secondary hyphae that kill host cells. As the lesion expands, the leading hyphae continue to grow biotrophically, and the hyphae in the central part of the lesion grow necrotrophically causing plant cell death (O'Connell *et al.*, 2012). The transition to necrotrophy in our laboratory conditions has been established around 60 hours post-inoculation (hpi) (Vargas *et al.*, 2012). We inoculated leaves with the *C. graminicola* M1.001 (WT) strain, and harvested samples every 12 hours, from 12 hpi to 72 hpi. In addition, we also harvested infected tissues at 96 hpi and 8 days post-inoculation (dpi). The time-course experiment revealed that *CPLS* expression occurs during the biotrophic stage, starting at 12 hpi and reaching a maximum peak at 48 hpi, and then decreases during the development of the necrotrophic stage. In contrast, very low levels of *CPLS* expression were detected in mycelium and conidia cultured *in vitro* (**Figure 26**).

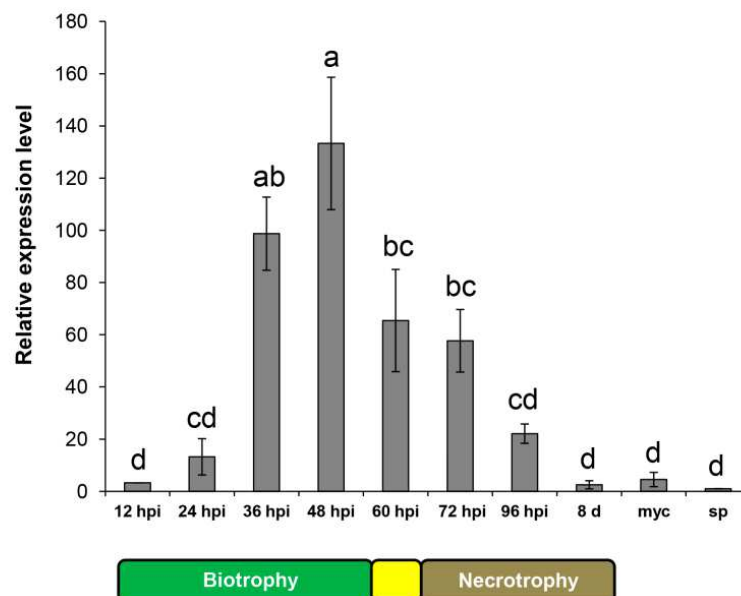


Figure 26. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of *CPLS* gene expression during anthracnose development. Maize leaves were inoculated with the *C. graminicola* M1.001

(WT) strain and samples were collected every 12 hours from 12 hpi to 72 hpi, and at 96 hpi and 8 dpi. Mycelium and conidia grown in *in vitro* conditions were also included. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to obtain relative expression values. The expression values were normalized relative to the expression level of the conidia samples. Bars represent the mean \pm standard deviation of three independent biological experiments. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.01$) as determined by one-way ANOVA followed by a Tukey's HSD test. hpi, hours post-inoculation; dpi, days post-inoculation; Myc, mycelium; Sp, conidia.

To further confirm these results, we generated a *C. graminicola* strain (PCPLS::GFP-1) that contains a transcriptional fusion of the *CPLS* promoter region to a *GFP* reporter cassette. We also constructed a transcriptional fusion between the β -*tubulin* promoter region and a *GFP* cassette ($P\beta$ -*tubulin*::GFP-a), which allowed us visualize the development of biotrophic and necrotrophic hyphae in colonized host cells. A time-course experiment was performed *in vivo*, by inoculating maize plants with both constructs. Inoculation sites of PCPLS::GFP-1 transformant were examined with confocal microscopy at 12, 48, 72 and 96 hpi. In the case of the $P\beta$ -*tubulin*::GFP-a control strain, high intensity signal was detected in both primary and secondary hyphae during all stages of the infection (**Figure 27e,f,g,h**). At 12 hpi, no GFP signal could be detected in germinating conidia, which indicates that *CPLS* is not being expressed at this time point, or is expressed at a level below the limits of detection of our assay (**Figure 27a**). However, strong GFP fluorescence was evident in hyphae of PCPLS::GFP-1 strain at 48 hpi and 72 hpi (**Figure 27b, c**). Finally, at 96 hpi GFP fluorescence of infection sites was weakly detected and only in a few hyphae on the leaf surface, indicating that *CPLS* is being down-regulated at this time (**Figure 27d**). Thus, the expression pattern of *CPLS* visualized in confocal microscopy corroborates the results obtained in the qRT-PCR experiment. These results demonstrate that *CPLS* expression is induced during the biotrophic phase of the infection process, and has a maximum level of expression at this time point. The expression of *CPLS* is maintained until at least 96 hpi, but at lower levels.

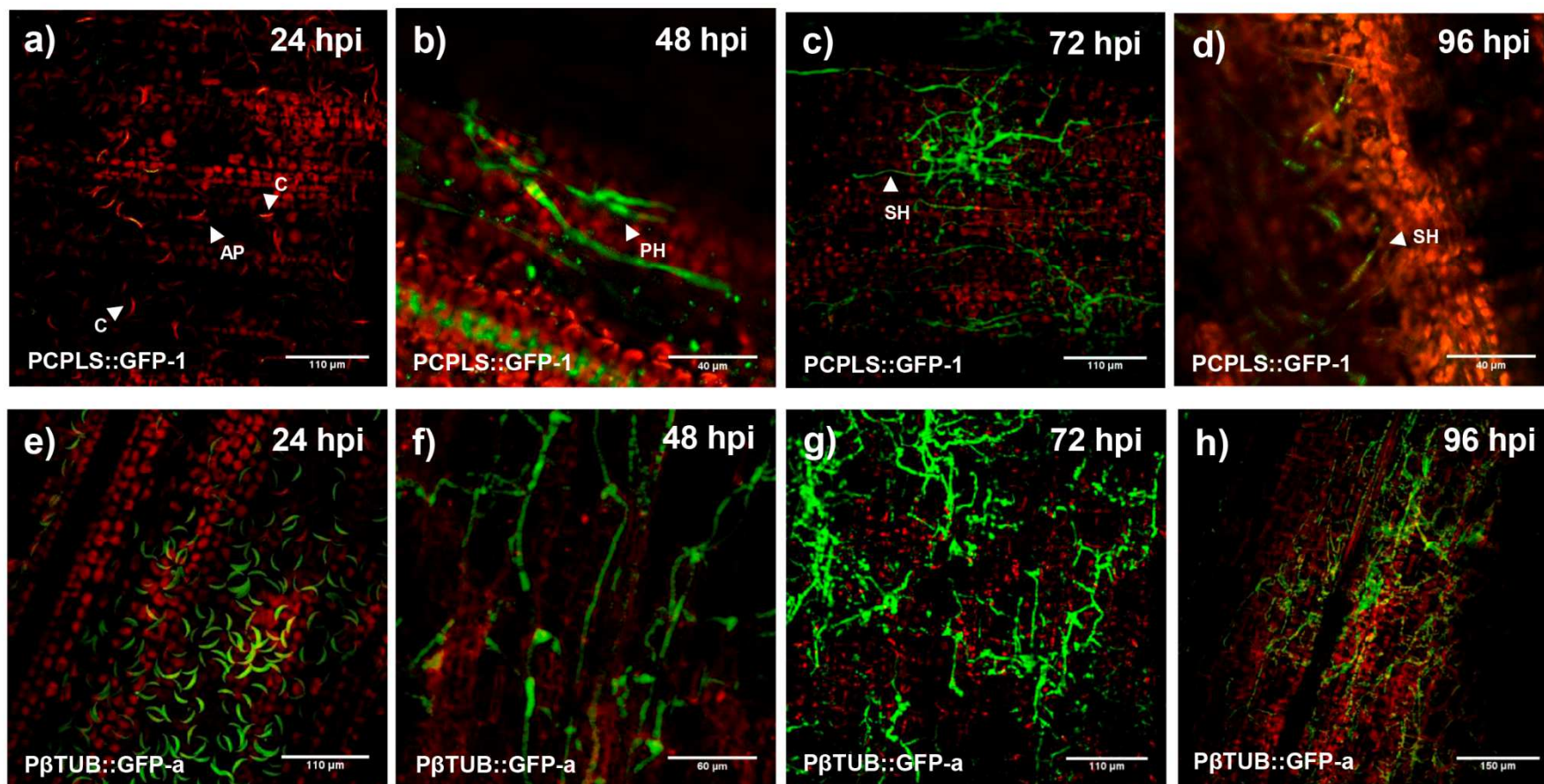


Figure 27. Time-course experiment of *CPLS* expression using a *CPLS* promoter-driven green fluorescent protein (GFP). The reporter gene *GFP* was fused to the promoter region of the *CPLS* gene (*PCPLS::GFP*). Fluorescence was detected by means of confocal laser scanning microscopy during a time-course infection assay of maize leaves. Micrographs in (a), (b), (c) and (d) were taken 12, 48, 72 and 96 hours post-inoculation, respectively. In addition, inoculation with the *PβTUB::GFP-a* strain allowed us visualize the development of biotrophic and necrotrophic hyphae in colonized host cells (e), (f), (g) and (h). AP, appressorium; C, conidia; PH, primary (biotrophic) hyphae; SH, secondary (necrotrophic) hyphae.

CPLS contributes to virulence in *C. graminicola*

To investigate whether CPLS is involved in the *C. graminicola* infection process, deletion constructs were prepared using the double-joint PCR method (Yu *et al.*, 2004) and transformed into the WT strain. Approximately 100 transformants were analyzed by PCR, of which two contained the expected gene deletion. The correct integration of the deletion constructs by homologous recombination was verified with Southern blot analyses (**Figure 28**).

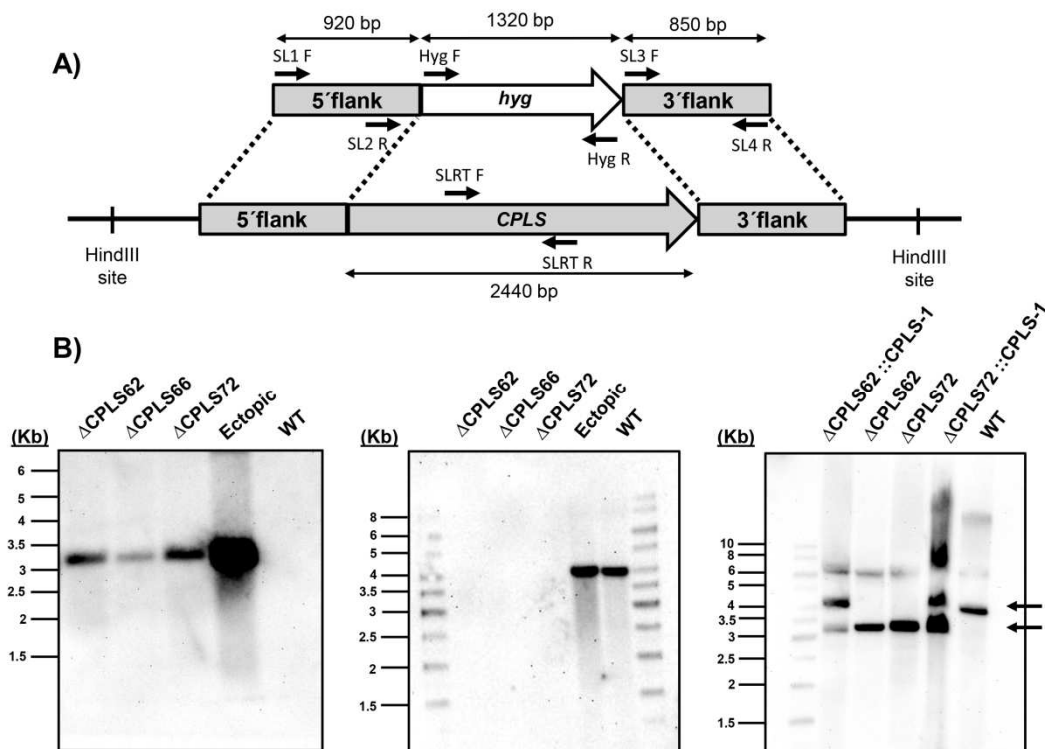


Figure 28. Construction and verification of *CPLS* transformants. (a) Schematic representation of the gene deletion cassette. **(b)** The transformants were verified via Southern blot analysis using several probes (probe 1- internal region of *CPLS* gene; probe 2- hygromycin cassette; probe 3- 5' flanking region of *CPLS* gene). Genomic DNA samples were digested with *Hind*III before Southern hybridization with probes 1, 2 or 3, respectively. WT, wild-type.

In addition, $\Delta CPLS$ transformants were tested for mycelial growth, both in solid and liquid media, sporulation and appressorium formation, and no significant differences were detected compared to the WT strain (**Figure 29 and 30**), indicating that CPLS has no role in these phenotypes.

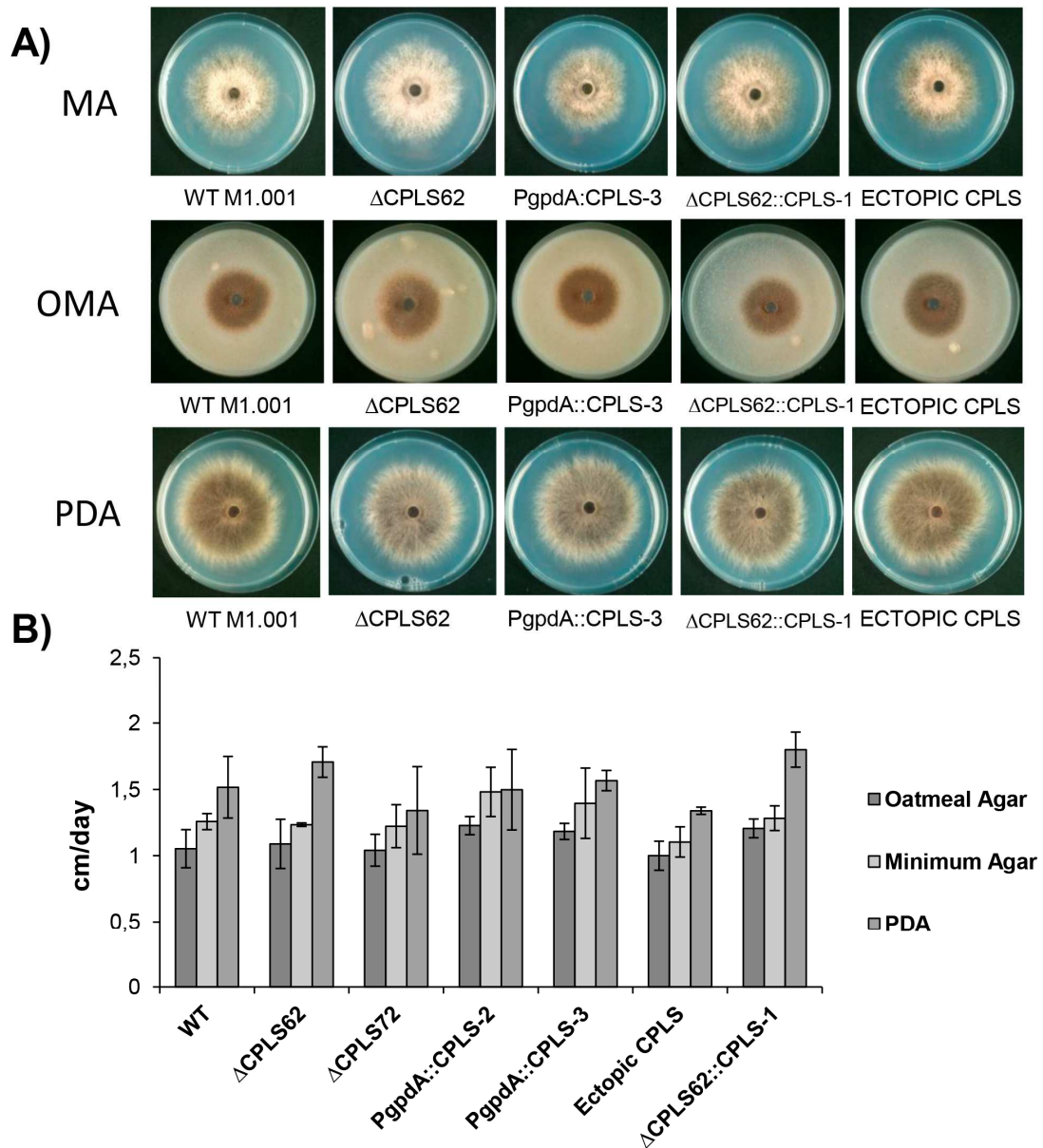


Figure 29. Growth and development of CPLS transformants. (a) Colony morphology. Minimum agar (MA), oatmeal agar (OA) and potato dextrose agar (PDA) cultures were incubated at 23°C and photographed at 6 dpi. **(b)** Radial growth rate. Each bar represents the mean \pm standard deviation from four colony replicates.

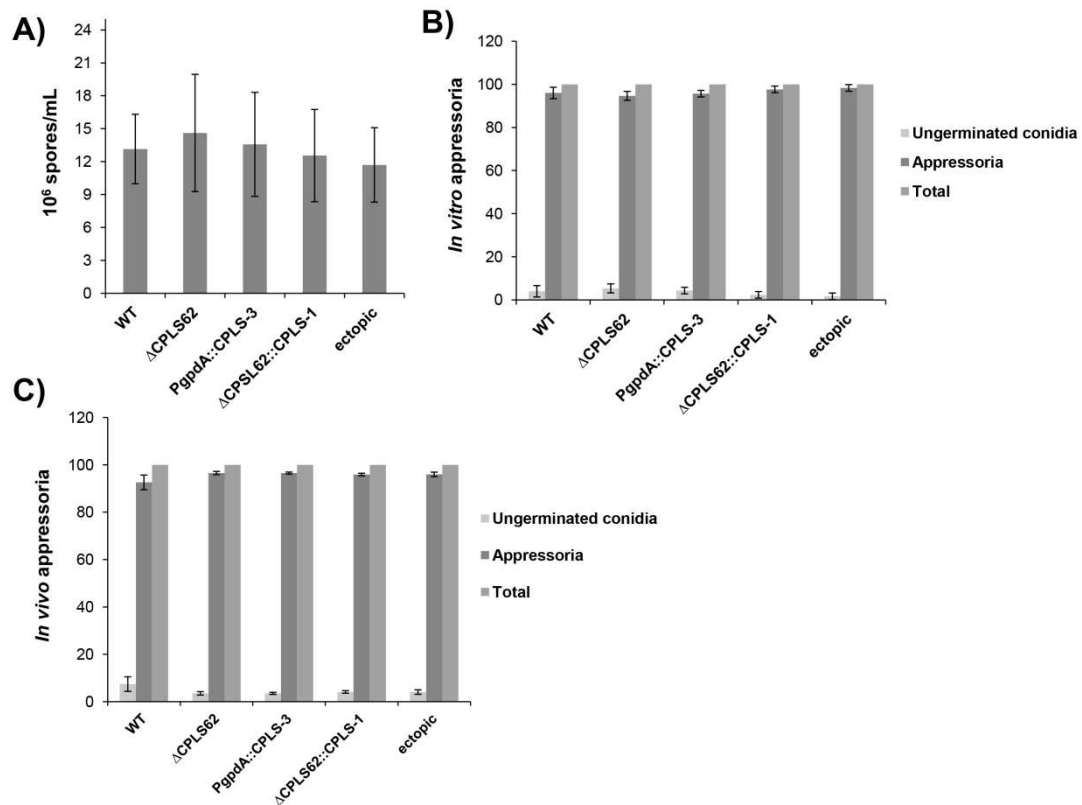


Figure 30. Conidia rate and appressoria formation rate assays of *CPLS* transformants. (a) Conidia rate of different transformants were performed using 21 days-old PDA plates. Bars represent mean \pm standard deviation from six independent assays. **(b)** *In vitro* appressoria formation rate assay. For each transformant, 100 conidia were counted. Bars represent mean \pm standard deviation from three independent experiments. **(c)** *In vivo* appressoria formation rate assay were performed using maize leaf sheaths inoculated with 3×10^5 conidia/mL of each transformant. Bars represent mean \pm standard deviation from three independent experiments.

Conidia of the Δ CPLS62 strain were applied to the leaves of three week old maize plants (V3 developmental stage) as previously described (Vargas *et al.*, 2012). No differences between lesions caused by the WT and Δ CPLS62 strains were seen at very early time points (not shown). Necrotic lesion areas were measured at 72 hpi, when *CPLS* is transcriptionally upregulated, and at 96 hpi, when expression is reduced. At 72 hpi, no differences in lesion sizes were detected between strains but at 96 hpi, significantly larger necrotic lesions were detected in the Δ CPLS62 mutant strain, consistent with a hypervirulent phenotype (**Figure 31**). Two different concentrations of conidia (3×10^5 and 10^6 sp/mL) were tested for plant inoculations, and in both cases the hypervirulence phenotype was observed (data of inoculations with 10^6 sp/mL conidial concentration are not shown).

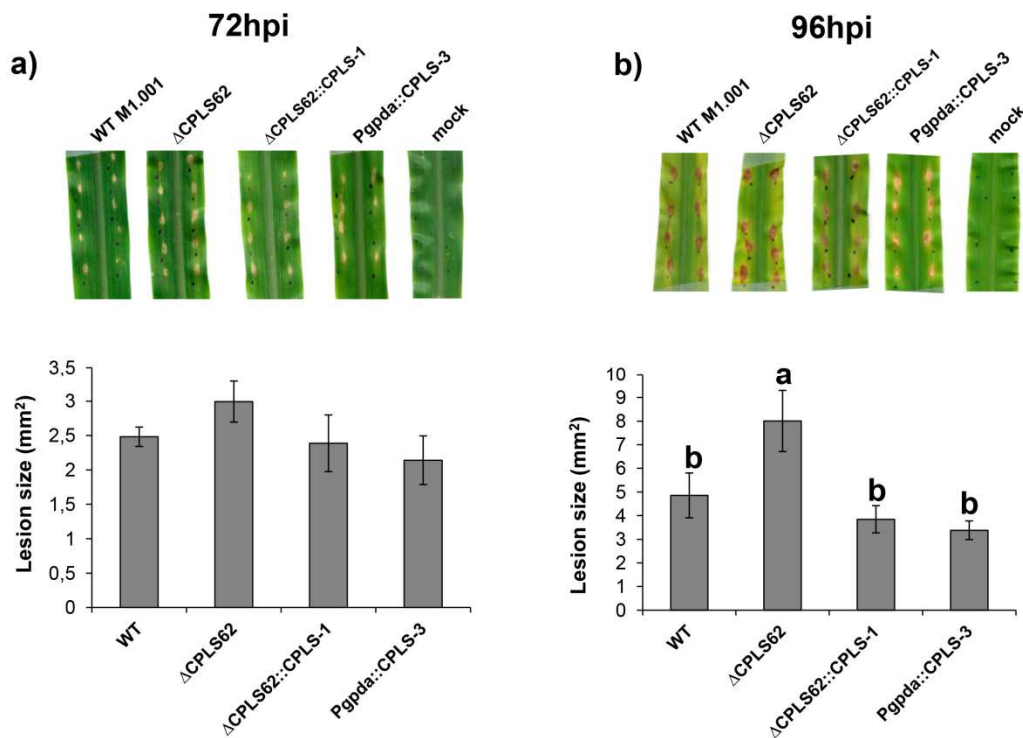


Figure 31. Disease symptoms on leaves of the susceptible maize line Mo940 infected with WT and Δ CPLS transformants. Leaves were inoculated with a conidial concentration of 3×10^5 sp/mL and collected at 72 (a) and 96 hpi (b), and necrotic lesion areas were measured using PAINT.NET image analysis software. Bars represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) using a one-way ANOVA followed by a Tukey's HSD test. No significant differences were found among the treatments at 72 hpi. WT, wild-type; hpi, hours post-inoculation.

A complementation strain was generated by reintroducing the wild-type *CPLS* allele, with its native promoter and terminator, into the Δ CPLS62 strain (Δ CPLS62::CPLS-1). We confirmed by qRT-PCR that the inserted gene was expressed as in the WT strain using fungal axenic cultures (Figure 32). Plant infection assays were performed with the complemented strain, and no significant differences in the size of the necrotic lesions were observed compared to the WT strain (Figure 4a, b), supporting the hypothesis that *CPLS* contributes to virulence in *C. graminicola*.

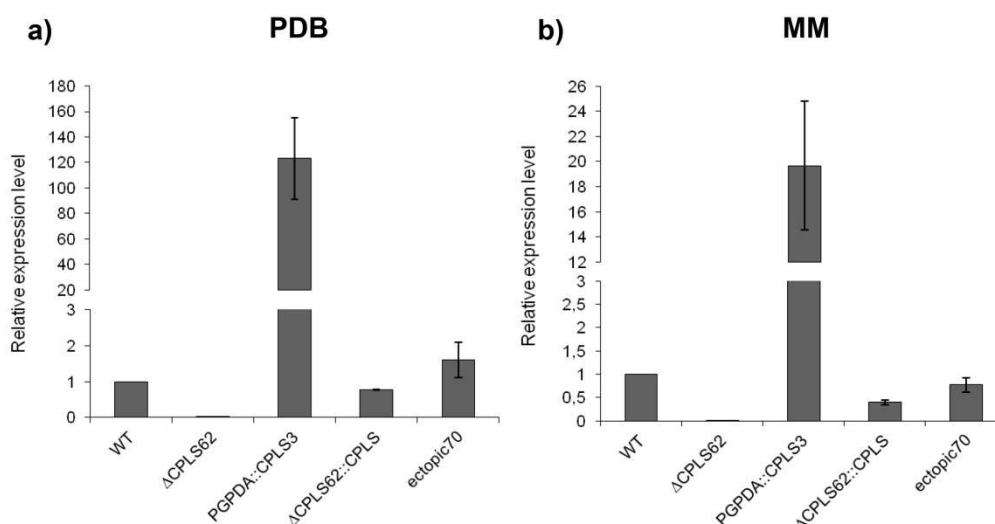


Figure 32. Validation of transformants by qRT-PCR. Transformants were grown in potato dextrose broth (PDB) and minimum medium (MM) at 25° C and 150 rpm for 4 days. *CPLS* expression levels were assessed by means of a qRT-PCR assay. Values were normalized to the expression of *C. graminicola* histone *H3* gene. Bars represent mean \pm standard deviation of three independent biological experiments. All measurements were normalized to the value obtained for WT expression (set to the arbitrary value of 1.0).

We also developed a *CPLS* constitutive expression construct (Pgpda::*CPLS*-3), using the pRF-HUE vector and USERTM Friendly cloning technology (Frandsen *et al.*, 2008). Transformants obtained with the *CPLS* gene under the control of the *A. nidulans* *gpdA* promoter were confirmed using qRT-PCR (**Figure 32**), and no phenotypic differences were observed in growth rate, morphology, appressorium formation or sporulation rate (**Figure 29 and 30**). However, contrary to our expectations, no significant differences in virulence were detected during leaf anthracnose assays at either time point of infection (**Figure 31a, b**).

***CPLS* deletion mutants have reduced fungal growth in maize leaves but not in roots**

To further investigate quantitative differences in the plant colonization process between the Δ *CPLS*62, Δ *CPLS*62::*CPLS*-1, Pgpda::*CPLS*-3 and WT strains, we assessed the amount of fungal biomass *in planta* by means of qRT-PCR assays. Maize leaves and roots were inoculated and collected and 96 hpi and 7 dpi, respectively. DNA was extracted, and the amount of *C. graminicola* genomic DNA relative to that of maize

was measured using the *C. graminicola* ITS2 and the *Z. mays* *EF1 α* gene. At 96 hpi, when the hypervirulent phenotype is evident, colonization by the Δ CPLS62 strain was significantly reduced as compared to the WT strain (**Figure 33a**). In contrast, we did not detect a significant difference between the Δ CPLS62::CPLS-1, PgpdA::CPLS-3 and WT strains (**Figure 33a**). To further investigate the leaf colonization process during the biotrophic stage, we also tested the fungal biomass at 48 hpi in plants inoculated with the WT strain and the Δ CPLS62 strain. Results showed that the accumulation of mycelium was also reduced in plants inoculated with the Δ CPLS62 strain (**Figure 34**).

Fungal biomass in roots was assessed at 7 dpi. At this time, colonization by *C. graminicola* is visible in the epidermis and first cell layers of the root cortex (Sanz-Martín *et al.*, 2016a). No differences were found in roots inoculated with the Δ CPLS62, Δ CPLS62::CPLS-1, PgpdA::CPLS-3 and WT strains (**Figure 33b**), suggesting that CPLS is not involved in root colonization. Together, these results show that the Δ CPLS62 mutant strain have reduced ability to colonize maize leaves, indicating that CPLS contributes to virulence in a tissue specific manner.

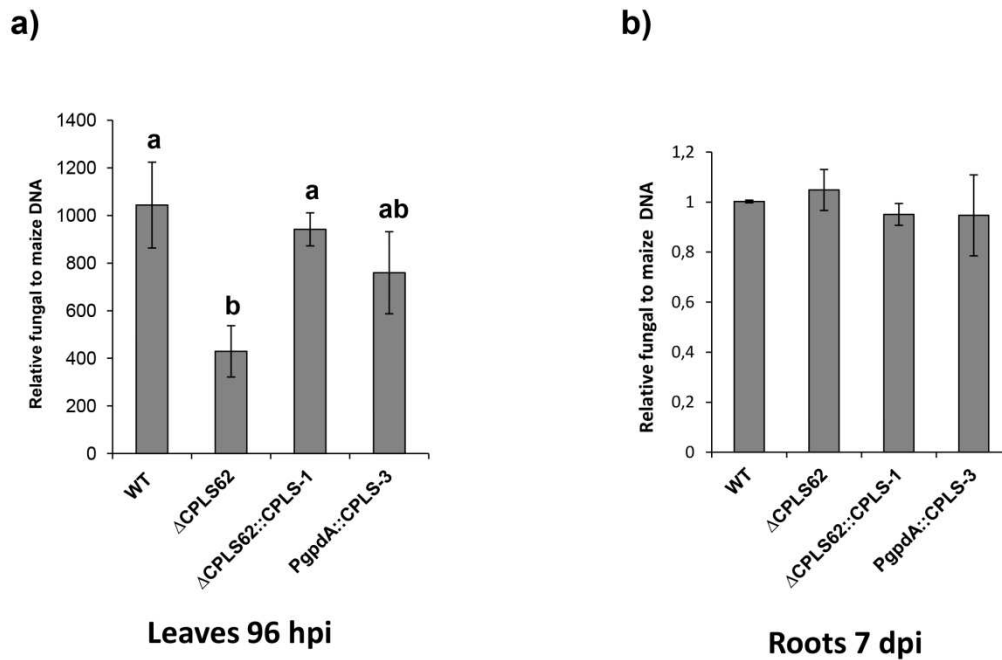


Figure 33. Quantification of fungal biomass in maize leaves and roots inoculated with WT and ΔCPLS transformants. *C. graminicola* gDNA quantity relative to that of maize was measured by assaying the *C. graminicola* ITS2 and the maize *EF1α* gene, using qRT-PCR. **(a)** Fungal biomass in maize leaves at 96 hpi. **(b)** Fungal biomass in maize roots at 7 dpi. Measurements were referred to the value obtained in mock-inoculated tissues. Bars represent means ± standard deviations of three independent biological experiments. Bars with different letters are statistically significantly different ($P < 0.05$) as determined by a one-way ANOVA followed by a Tukey's HSD test. WT, wild-type; hpi, hours post-inoculation; dpi, days post-inoculation.

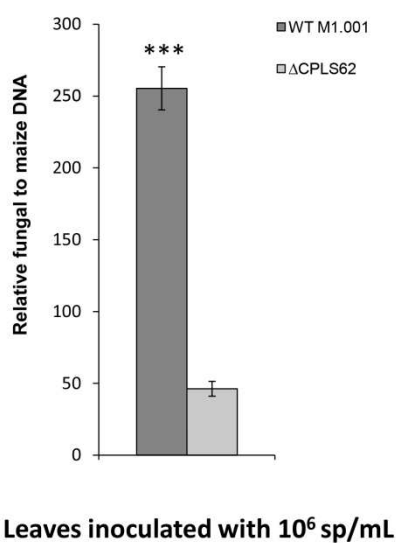
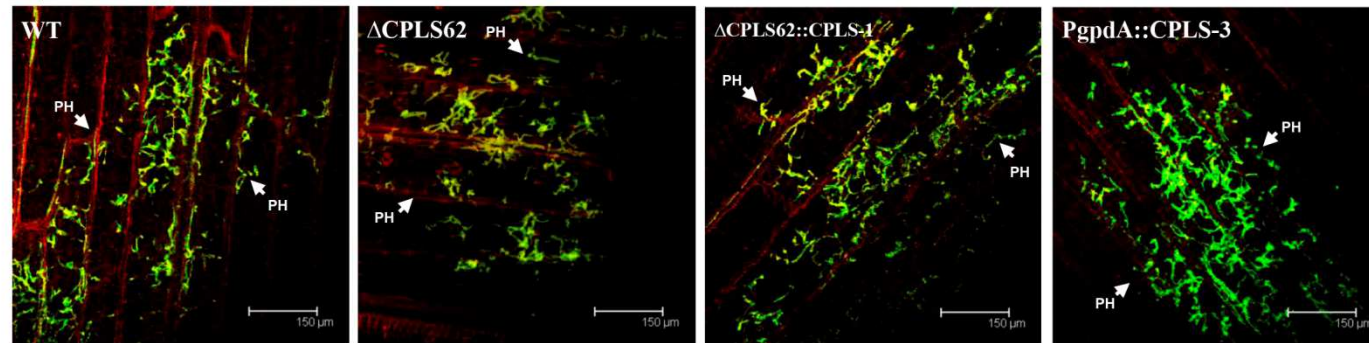


Figure 34. Quantification of fungal biomass in maize leaves colonized by WT and ΔCPLS62 strains of *C. graminicola* at 48 hpi. WT DNA (dark grey) or ΔCPLS62 DNA (light grey) relative of that to maize was measured by means of qRT-PCR using the *C. graminicola* ITS2 and the maize *EF1α* gene. Significant differences were observed for WT strain ($P < 0.001$). Error bars indicate the standard deviations in three independent biological experiments.

To confirm the normal development of the *CPLS* transformants (Δ CPLS62, Δ CPLS62::CPLS-1 and PgpdA::CPLS-3) on infected maize leaves, we stained infected leaf samples at 48 hpi and 96 hpi using WGA-AF488/propidium iodide double staining and visualized them by confocal laser scanning microscopy. No differences or visible defects were seen in the morphology of biotrophic or necrotrophic hyphae as compared to the WT strain (**Figure35**).

A) 48 hpi



B) 96 hpi

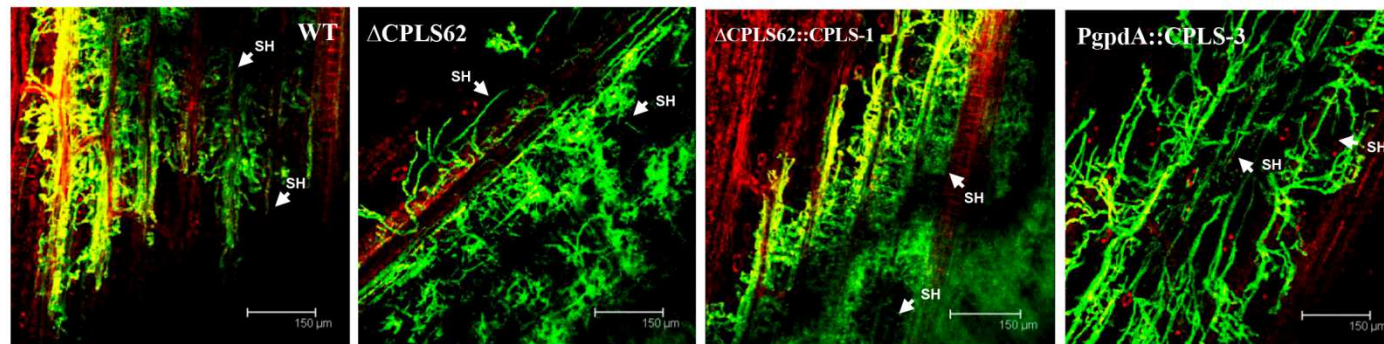
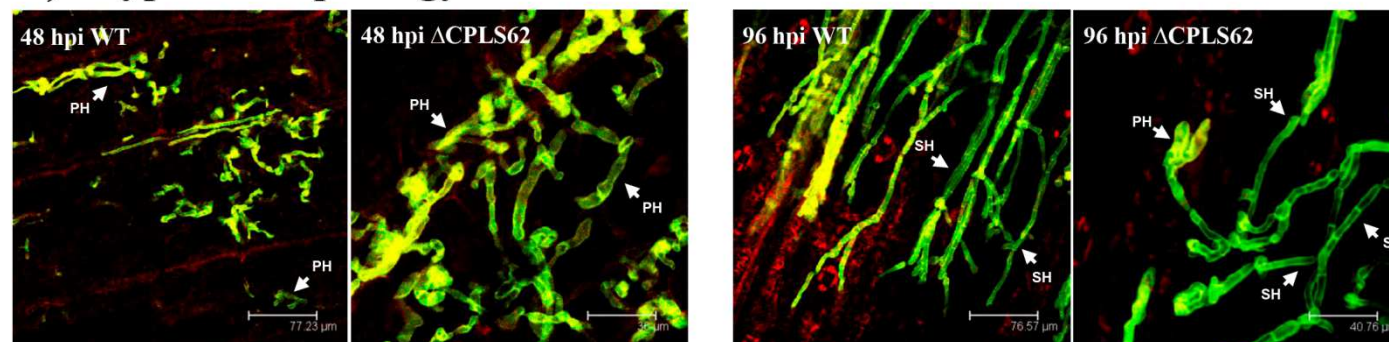
C) Hyphal morphology WT vs. Δ CPLS62

Figure 35. Confocal laser scanning microscopy image analysis of plants inoculated with CPLS transformant strains. WGA-AF488/Propidium iodide double stained hyphae of the WT and Δ CPLS62 strains on infected maize leaves at 48 hpi (a) and 96 hpi (b). Fungal cell walls (green) and plant cells (red) are visible in the infected plant tissue. (c) Hyphal morphology of the WT and Δ CPLS62 strains at 48 hpi (biotrophic hyphae) and 96 hpi (necrotrophic hyphae). WT, wild-type; hpi, hours post-inoculation.

CPLS regulates the expression of two NLR–encoding genes in maize

It has been previously shown that many of the known maize defence response genes are activated during infection with *C. graminicola*, including during the early biotrophic stage of infection (Vargas *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2016). The Δ CPLS62 strain induces a hypervirulent response in maize leaves, suggesting a possible linkage of CPLS to plant cell death processes. Therefore, we focused on two genes (*GRMZM2G069382* and *GRMZM2G061742*), that have been previously described as having roles in PCD (Olukolu *et al.*, 2014; Wang & Balint-Kurti, 2015). We monitored the expression of these genes at several time points during infection of maize leaves with the WT strain and the Δ CPLS62 strain. When plants are infected with the WT strain, both genes were downregulated at 24 hpi, but were strongly upregulated in plants infected with the Δ CPLS62 strain (**Figure 36**). Interestingly, in plants infected with the Δ CPLS62 strain, both genes are also strongly upregulated at 96 hpi, during the necrotrophic stage of the infection. These results suggest that CPLS is needed for the suppression of the expression of these NLR immune receptors involved in PCD at early and at late time points of the infection. Thus, and in conjunction with the reduction in fungal biomass during infection of maize leaves with the Δ CPLS62 strain, we speculate that CPLS might promote fungal colonization by suppressing plant PCD processes.

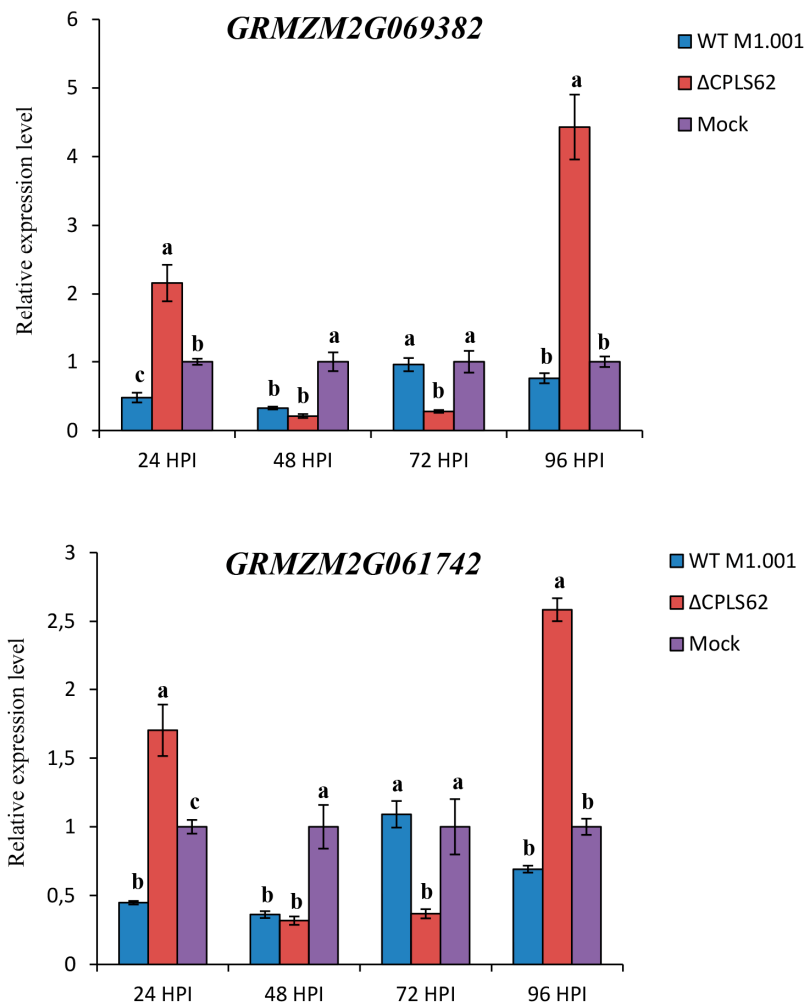


Figure 36. Relative expression of maize genes associated with PCD during the infection process. qRT-PCR analysis of *GRMZM2G069382* and *GRMZM2G061742* expression in maize leaves after inoculation with the WT and CPLS transformant strains. An arbitrary value of 1.0 was denoted for the mean transcript level of PCD-related genes in plants inoculated with water. Expression values of the individual genes were normalized using the maize *EF1 α* gene as internal standard. Bars \pm standard deviations (SD) denote mean expression values of three independent biological experiments. Statistical differences according to a Tukey's HSD test ($P < 0.05$) are indicated by letters. WT, wild-type; hpi, hours post-inoculation.

Discussion

Successful pathogens have evolved strategies to suppress plant defence responses and overcome plant immunity. Plant proteases, including subtilisins, are involved in perception and signaling upon pathogen attack and lead to induction of plant defence responses and PCD (Tian *et al.*, 2004; Vartapetian *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2014; Ökmen & Doehlemann, 2014). Previously, we showed that a plant subtilisin, CPLS, was acquired by *Colletotrichum* spp. through an ancient HGT event from plants to an ancestor of *Colletotrichum* spp. (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a). This finding was based on the available genome sequences of several members of the genus *Colletotrichum* at that time, and was subsequently confirmed for more *Colletotrichum* species (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013b; Baroncelli *et al.*, 2016). Interestingly, CPLS homologs were absent in all other fungi, suggesting that the HGT events immediately preceded the radiation of *Colletotrichum* spp. (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a).

In this work, we constructed a phylogeny of CPLSs and found that all 14 species of *Colletotrichum* with genomes available carry at least one CPLS copy. This analysis also revealed that CPLS homologs are also present in only one other genus, *Diaporthe*, a large genus that contains plant pathogens, endophytes and saprobes, with a worldwide distribution and a broad diversity of plant hosts (Uecker, 1988; Gomes *et al.*, 2013). We also found that CPLS is conserved in seven other *C. graminicola* isolates with whole genomes sequenced. The highly conserved distribution within *Colletotrichum* suggests that its function is conserved in these species and that loss of the gene must have a significant impact to fitness. The phylogeny shows that both *Colletotrichum* and *Diaporthe* acquired CPLS through a single HGT event. Other closely related fungi such as *Verticillium* lack CPLS orthologs, indicating that some descendants of the fungus that originally acquired CPLS have evolved different infection strategies.

HGT is an influential force driving the evolution of prokaryotes and eukaryotes, and generally play important roles in the acquisition of new virulence functions that contribute to pathogen fitness (Gardiner *et al.*, 2013). Most horizontally transferred genes in fungal genomes appear to have originated from fungi and bacteria, and few

cases of HGT from plants to fungi exist. Besides CPLS, only two other cases of plant to fungus HGT have been described, and only one presents functional evidence linking the gene function to pathogenicity (Gottig *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2012; Soanes & Richards, 2014). Thus, HGT from plants may be a rare but important source of genes that can target key components of the plant immune system and aid fungi in infecting plants.

The field of fungal effector biology has rapidly advanced in recent years due to the continuing decline in the cost of genome sequencing technology, enabling the identification of putative secreted proteins with potential roles in pathogenicity (Schirawski *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2012; Pendleton *et al.*, 2014; Persoons *et al.*, 2014). Nevertheless, our knowledge of the role of fungal effectors during plant infection is limited, and there are hundreds of effectors with unknown function waiting to be studied. Diverse analyses have revealed that putative effector encoding genes of *Colletotrichum* are transcriptionally modulated and different effectors are expressed at different points of the infection process, suggesting stage-specific functions (O'Connell *et al.*, 2012; Gan *et al.*, 2013; Sanz-Martín *et al.*, 2016a). In contrast, the majority of proteases and lytic enzymes are secreted during the late biotrophic phase and the transition to necrotrophy (O'Connell *et al.*, 2012; Gan *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016). Here we show that *CPLS* is most strongly expressed in maize leaves at 36 and 48 hpi, during the biotrophic stage of infection. In addition, live cell imaging using a *PCPLS::GFP* strain shows that transcriptional activation of *CPLS* extends to 96 hpi but at much lower level. These data indicate that *CPLS* expression is tightly regulated during the infection process. The 3'-downstream region of the genes shows evidence of positive selection. Positive selection is a major force underlying the adaptation of species to new environments, and the 3'-downstream is known to be important for the transcriptional regulation of genes. Thus, these findings suggest that there has been strong selection for the transcriptional profile of *CPLS*, possibly so that the protein is present when it is most active, but absent at other time points to escape detection by the host. Interestingly, transcriptional modulation seems to be a general characteristic of *Colletotrichum* effectors. We have previously shown that another *C. graminicola* protease effector is only expressed at specific time points during the infection process

(Sanz-Martín *et al.*, 2016a). These studies suggest that individual effectors are not needed during the whole infection process, and may even be detrimental at some time points.

It has been previously shown that subtilisin-like proteases are important for phytopathogenic fungi during the infection process (Saitoh *et al.*, 2009, p. 1; Shi *et al.*, 2014, p. 1). In this study, we show that the plant-like CPLS plays a role in the *C. graminicola* pathogenicity. Targeted deletion of *CPLS* contributes to an increase the lesion size of *C. graminicola* during maize leaf anthracnose assays, but also reduces fungal biomass accumulation. In contrast, no differences were observed in fungal biomass accumulation of infected maize roots at 7 dpi between the WT and the Δ CPLS62 strains. Also, no *CPLS* expression was detected by RT-semi-quantitative-PCR analysis, supporting the assumption that *CPLS* is not required for root colonization. It has been previously described in other filamentous pathogens that effectors could display tissue-specific properties. For instance, *U. maydis* secretes different sets of effectors when colonizing leaves or inflorescences, and deletion of these genes affects virulence in an tissue-specific manner (Skibbe *et al.*, 2010; Schilling *et al.*, 2014). Similar conclusions were made for *M. oryzae*, in which it was suggested that pathogenesis in leaves and roots are uncoupled processes regulated by tissue-specific effectors (Tucker *et al.*, 2010; Marcel *et al.*, 2010). Although *C. graminicola*-maize effectors have been previously described, they have been shown to contribute to disease development in different tissues (Sanz-Martín *et al.*, 2016a; Vargas *et al.*, 2016) CPLS is the first tissue specific effector described in maize. This result shows that even though *C. graminicola* can infect all plant parts, its genome carries adaptations to specific tissues.

We selected two maize genes that encode CC-NLR immune receptors with a NB-ARC domain, by their functional role in PCD (Olukolu *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2016) to test their expression patterns during infection. These NLR proteins have a conserved NB-ARC domain, that acts as a molecular switch regulated by nucleotide binding and ATP hydrolysis activity. The activation of this domain involves the exchange of ADP for ATP through a structural change and results in regulation of plant defence and cell death (Takken *et al.*, 2006; Spoel & Dong, 2012). The NB-ARC motif is also shared by APAF-1 and CED-4, protein regulators of PCD in mammals and

nematodes, respectively (Van der Biezen & Jones, 1998). We found that both NLR proteins were suppressed at the biotrophic stage of the infection but not during the necrotrophic stage. Other studies from fungal and oomycete hemibiotrophs have identified proteins that act during the biotrophic stage of the infection to suppress the plant immune response, leading to the suppression of host cell death (Kelley *et al.*, 2010; Kleemann *et al.*, 2012; Sharpee *et al.*, 2016). For instance, the small secreted protein CgDN3 of *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare* can suppress induced cell death in their hosts (Stephenson *et al.*, 2000; Yoshino *et al.*, 2012). NLR gene expression profiles were differentially induced in leaves inoculated with the Δ CPLS62 strain at 24 and 96 hpi. Remarkably, these patterns correlate with the absence of *CPLS* expression during infection. Therefore, we hypothesize that *CPLS* inhibits the expression of these plant targets. The transcript profiles of other maize genes suggested to be involved in cell death processes, such as Bax-inhibitor-1 and cystatins (Doehlemann *et al.*, 2008; Linde *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2016), will be analyzed by RNA sequencing to determine if they have changes in their expression.

There are few cases of null mutants causing a hypervirulent phenotype in fungal plant pathogens (Kämper *et al.*, 2006; Schirawski *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015). It has been suggested that, in the case of biotrophs, hypervirulence may indicate that the protein attenuates fungal growth, in order to prevent host cell death (Kämper *et al.*, 2006). Other authors propose that genes whose deletion leads to hypervirulence encode weak Avr proteins that trigger defence responses in plants expressing the cognate receptor, resulting in an attenuation of fungal growth (Schirawski *et al.*, 2010). *CPLS* null mutants have larger necrotic lesion size but reduced fungal biomass, indicating that the protein contributes to biomass accumulation during both biotrophy and necrotrophy. We propose that *CPLS* aids the fungus during infection by suppressing PCD. In the absence of *CPLS*, PCD occurs causing larger lesion size. Reduced fungal biomass may be due to activation of other plant immune responses, which act to restrict fungal growth but nevertheless are not sufficient to prevent colonization of the leaf tissue. We also found that the absence of *CPLS* leads to an increase in fungal virulence on maize leaves but not in roots. Furthermore, two CC-NLR immune receptors involved in PCD were up-regulated during the infection with the

Δ CPLS62 strain, indicating a possible role of CPLS in plant cell death. Thus, we confirmed that CPLS is an effector that modulates the host immune response, specifically in maize leaves. Clearly, further characterization of CPLS is needed, and the localization and identification of the *in vivo* substrate will be helpful in understanding the function of this protein.

Materials and methods

Identification of CPLS homologs and phylogenetic analysis.

A BLASTP search of the *non-redundant* protein sequences (nr) database was done (e-value threshold: 10^{-5}) using the predicted subtilisin protein sequences from *C. graminicola* (locus tag, GLRG_05578; GenBank accession number EFQ30434) (Armijos Jaramillo *et al.*, 2013a) as the query sequence. Additional tBLASTn searches versus specific genomes were also performed to confirm the absence of CPLS in some species. A complete list of protein sequences is reported in **Additional file 1 (see digital version)**.

Reference sequences of peptidase family S8A were downloaded from the MEROPS database (Rawlings *et al.*, 2012) and used, along with the proteins identified by the BLASTP searches used for phylogenetic tree reconstruction. The protein sequences were aligned using MAFFT version 7 (Kato & Standley, 2013) and the phylogenetic tree was built by means of MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The best substitution model and its parameter values were obtained using ProtTest (Abascal *et al.*, 2005). A phylogenetic tree was reconstructed under the WAG + I evolutionary model; the gamma distribution was calculated using four rate categories and homogeneous rates across the tree. The posterior probabilities threshold was 50%.

Fungal strains and growth conditions

Colletotrichum graminicola M1.001 BH wild-type strain and its derivative GFP-tagged strain M1.001 GFP were used in this study as reference strains. Strains were grown on potato dextrose agar (PDA) or oatmeal agar (OMA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and were incubated at 23°C under continuous white light as described previously (Sukno *et al.*, 2008b). To obtain vegetative mycelium, liquid cultures were grown in potato dextrose broth (PDB) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and minimal medium supplemented with 1% sucrose, and incubated at 25°C with orbital shaking at 180 rpm. To phenotypically characterize the strains, *in vitro* growth rate assays, sporulation rate assays and *in vitro* and *in vivo* appressorium formation rate assays were performed as described previously (Thon *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002).

Plant infection assays

Anthraxnose leaf blight assays were performed as described previously (Vargas *et al.*, 2012) using a derivative of the susceptible maize inbred lines Mo940 (Warren *et al.*, 1975). To measure lesion areas of infected leaves, the leaves were excised from the plant, scanned with a flat-bed scanner and quantified using the imaging processing software Paint.NET 4.0.3 (dotPDN LCC). Lesion sizes were tested with a completely randomized analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) test. Root assays were conducted following the protocol of Sukno *et al.* (Sukno *et al.*, 2008b). Briefly, *C. graminicola* strains were grown on Petri dishes containing PDA covered with a 45 nm nitrocellulose membrane (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), for 15-20 days. Maize seeds were incubated for 4 days at 25°C in a moisture chamber, until they developed 2-3 cm roots. Two pieces of nitrocellulose membrane (2mm x 2mm) covered with mycelium were cut and placed on the root surface. The samples were incubated at 25°C, in a humid environment, for 7 days. Infected roots sections were stained in 10% propidium iodide for 10 minutes and examined with a confocal microscope. For qRT-PCR assays, inoculation of maize leaves was performed with a conidial concentration of 10^6 sp/mL. For all experiments, three biological replicates were performed.

Gene deletion and complementation

The *CPLS* deletion construct was prepared using the double-joint PCR method described by (Yu *et al.*, 2004). This technique has been used to easily delete filamentous fungal genes by combining two or three DNA fragments. The 5' and 3' flanking regions of GLRG_05578 coding sequence were amplified by PCR using the primer pairs SL-1, SL-2 and SL-3, SL-4 (**Table 3, see Supporting Information**). The hygromycin B phosphotransferase (*hph*) cassette was PCR amplified from the pKW1 vector (Vargas *et al.*, 2016), and used as selective marker to build the gene disruption construct. This construct was confirmed by sequencing and transformed into *C. graminicola* M1.001 protoplasts, as described previously (Thon *et al.*, 2000; Sukno *et al.*, 2008b). Transformants containing the *CPLS* replacement via homologous double crossover were identified by PCR amplification of internal and flanking regions using different sets of primers (**Table 3, see Supporting Information**).

To generate the construct for complementation, the *CPLS* gene including the coding sequence and 1 kb of upstream and downstream sequence, was amplified using primers SLCOMP F and SLCOMP R and ligated into the pENTR/D-TOPO™ vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by Gateway® technology. The construct was recombined into the pKW4 plasmid (Vargas *et al.*, 2016), which contains a *GFP* cassette and the nourseothricin resistance gene (*Nat*), using the LR Clonase II enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The pKW4-CPLS plasmid was used to transform ΔCPLS62 strain protoplasts. The transformed fungal colonies were confirmed by PCR using primers GFP F and SLCOMP R.

Isolation of genomic DNA and Southern blot analysis

Genomic DNA was extracted from frozen fungal material following the protocol of Baek and Kenerley with some modifications (Baek & Kenerley, 1998a). The concentration of DNA preparations was assessed with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). For Southern blot analysis, 10 µg of fungal genomic DNA were digested with *HindIII* (Takara Bio Inc., Otsu, Japan), separated on 0.8% (w/v) agarose gel, denatured and transferred to a

nitrocellulose membrane (Amersham HyBond-N, GE-HealthCare, Little Chalfont, UK). Probes were generated using the PCR Digoxigenin (DIG) Labeling Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions, and the primer pair SL-1 and SL-2 that amplify the 5' flanking region of *CPLS* coding sequence. Primer pairs SL-RT F, SL-RT R and HYG F, HYG R were also used in order to ensure single integration events in the desired locus. The membrane was hybridized and washed under high stringency conditions as described by Sambrook and Russell (Sambrook & Russell, 2001).

RNA isolation and quantitative real-time analysis of gene expression

Total RNA from frozen plant and fungal tissues was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. To remove traces of genomic DNA, samples were treated with Turbo DNA free DNase (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA). The cDNA was synthesized using a PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) from 500 ng of total fungal RNA or 1 µg of total RNA in the case of *Z. mays* plants infected with *C. graminicola*. To confirm the absence of genomic DNA, RT-PCR and qRT-PCR assays were performed without reverse transcriptase.

Quantitative RT-PCR was carried out in 10 µL reaction mixtures containing 1X KAPA SYBR[®] Green qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), 500 nM forward and reverse primers and 1 µL of the reverse transcription reaction. Amplifications were conducted in a StepOnePlus[™] Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following program: 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 30 sec. The accuracy of the SYBR[®] Green detection was verified by checking the melting curves for the presence of only one specific peak. The PCR product size was checked by electrophoresis in 2.5% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide. Samples were collected from three different plant infection assays and an independent set of cDNAs were prepared for each biological replicate. The relative transcript abundance was normalized using the constitutively expressed control gene histone *H3* (Krijger et al., 2008). Relative expression levels were

calculated using the comparative Ct method (Livak & Schmittgen, 2001). All Ct calculations were performed using the StepOne™ software (version 2.2.2, Applied Biosystems) and a Tukey's HSD test was applied to test the significance of different gene expression levels. All gene-specific primers used in qRT-PCR reactions are listed in **Table 3 (see Supporting Information)**.

Quantification of fungal biomass

Relative quantification of fungal DNA in infected tissue samples was assessed by qRT-PCR. Maize leaves infected with *C. graminicola* strains were harvested at 48 and 96 hpi, and lesion samples were excised with a 5 mm diameter cork borer. For genomic DNA extraction, the leaf material was frozen in liquid nitrogen, ground to a powder, and extracted using a CTAB-based protocol (Irfan *et al.*, 2013). Fungal biomass was estimated as the relative quantity of *C. graminicola* DNA normalized to an endogenous control of *Z. mays* DNA using the cycle threshold (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The qRT-PCR components and cycling conditions were as described above, except that 10 ng of genomic DNA was used as template for the reaction. Fungal DNA was detected using the internal transcriber spacer 2 (ITS2) of the ribosomal RNA-coding DNA cluster (rDNA) (Weihmann *et al.*, 2016) with the primers CgITS2 F1.1 and CgITS2 R1 (**Table 3, see Supporting Information**). To normalize differences in DNA templates, the maize endogenous gene elongation factor 1 alpha *EF1α* (Lin *et al.*, 2014) was amplified using the primers EF1α F and EF1α R (**Table 3, see Supporting Information**). Genomic DNA from mock inoculated maize plants was used as a negative control to create the standard curves. Samples were collected of three independent biological experiments and the assays were evaluated two times for each replicate. Calculations and subsequent statistical analyses were performed using StepOne™ software (version 2.2.2, Applied Biosystems), Microsoft Office 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and Statistix 8 (Analytical software, FL, USA).

Development of *PCPLS::GFP* transcriptional fusion and *CPLS* constitutive expression strains

To generate the *PCPLS::GFP* transcriptional fusion, the *CPLS* gene promoter was predicted to be 1.1 kb upstream of *CPLS* start codon. This fragment was amplified by PCR from the WT strain using genomic DNA as template and primers SLFTr Fw and SLFTr Rv. The fragment was cloned using the pENTR/D-TOPOTM vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and recombined by Gateway[®] technology into the pKW3 destination vector, which contains a *GFP* cassette (Vargas *et al.*, 2016). The construct was transformed into *C. graminicola* M1.001 protoplasts, and *PCPLS::GFP* transformants were confirmed by PCR using the primers SLFTr Fw and GFP Rv. A construct fusing the β -*tubulin* promoter to the *GFP* coding sequence was prepared to visualize the WT infection process following the same strategy.

A strain constitutively expressing *CPLS* was constructed by fusing the *gpdA* promoter from *Aspergillus nidulans* to the *CPLS* coding sequence. The pRF-HUE binary vector (Frandsen *et al.*, 2008) was used to generate this construct (*PgpdA::CPLS*). The *CPLS* coding sequence was amplified using the primers SLOE Fw and SLOE Rv, and ligated into the pRF-HUE plasmid, which was previously digested with *PacI* and *Nt.BbvCI* enzymes (New England Biolabs, Ipswich, USA), by USERTM Friendly cloning reaction. The resulting vector, pRF-HUE-CPLS, was used to genetically transform *C. graminicola* M1.001 protoplasts. The transformed fungal colonies with ectopic integrations were selected by hygromycin resistance. Construction and transformants were confirmed by PCR using the primers Pgpda Fw and SLOE Rv, and by Southern blot analysis. All generated constructs were checked by sequencing before the transformation of *C. graminicola*.

WGA-AF488/Propidium iodide staining

Harvested leaf samples from two independent plant experiments were de-stained overnight (or longer) in 100% ethanol. Ethanol was exchanged if necessary. Next, the leaves were incubated in 10% KOH at 85°C for 5 min. The samples were then washed 3–4 times with 1X PBS (pH 7.4), and the staining solution was added. The samples were

vacuum infiltrated five times for two minutes using a Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), de-stained in PBS and stored overnight at 4°C. The staining solution was prepared using 20 µg/ml propidium iodide, 10 µg/ml WGA-AF488, and 0.02% tween 20 in 1X PBS (pH 7.4).

Microscopy analysis and imaging

Confocal microscopy was performed using a laser scanning spectral confocal microscope (TCS2-SP2, Leica Microsystems, Germany). Excitation was provided by an argon laser at 488 nm and GFP fluorescence was detected at 495-520 nm. Plant tissue autofluorescence and propidium iodide fluorescence was detected in a range of 595-680 nm. Projections were generated from adjusted individual channels in the image stacks using Leica Confocal Software (Leica Microsystems, Germany). Bright field and fluorescence microscopy was carried out with a Leica DMLB fluorescence microscope equipped with a Leica DG300F digital camera and Leica IM1000 software.

Supplementary Material

Table 3. List of primers used in the study.

Primer name	Sequence 5'-3'	Description	Reference
SL-1	GCCACCGCAGGCTATACGACC	Amplification of 5' flanking region of GLRG_05578	This article
SL-2	CTCCTCAATATCAGTTAACGTCGATC	Amplification of 5' flanking region of GLRG_05578	This article
SL-3	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGA	Amplification of 3' flanking region of GLRG_05578	This article
SL-4	TGTGACGACGCCCTCTACGCT	Amplification of 3' flanking region of GLRG_05578	This article
SLRT F	GTCGTCGGCTCCTATGCCGC	GLRG_05578 RT-PCR	This article
SLRT R	GTGCTGTTGCCGTTGCTGGC	GLRG_05578 RT-PCR	This article
CTub F	CAGTCCCTGGGCGGCACAG	<i>C. graminicola</i> β -Tubuline RT-PCR	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
CTub R	CCCGGGGCAATTGACGCC	<i>C. graminicola</i> β -Tubuline RT-PCR	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
SLKO F	ACTCGCCTCGACCGCTTCAAC	Confirmation of deleted clones	This article

SLKO R	ACACGCTGGGAAGTTTGCCGT	Confirmation of deleted clones	This article
HYG F	GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAG	Amplification of <i>hph</i> cassette	This article
HYG R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCT	Amplification of <i>hph</i> cassette	This article
SLCOMP F	CACCGATCCGCCCAAGATCCTGG	Amplification of GLRG_05578 cassette for complementation	This article
SLCOMP R	CGACGCCCTCTACGCTAATT	Amplification of GLRG_05578 cassette for complementation	This article
GFP R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	Amplification of <i>GFP</i> cassette	This article
SLOE F	GGACTTAAUAGATGACCAAGAGTTCCGCG	GLRG_05578 constitutive expression	This article
SLOE R	GGGTTTAAUTACCCACTGGAAAACCTCGG	GLRG_05578 constitutive expression	This article
PgpdA SeqF	GTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGT	Sequencing from <i>gpdA</i>	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
PgpdA SeqR	TCCCACTTCATCGCAGCTTGACTA	Sequencing from <i>gpdA</i>	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
TubFus F	CCCCTACTCAAGACAGGTGGT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	(Sanz-Martin <i>et al.</i> , 2016a)
TubFus R	CACCAGCTTCTGCCCCACGGTTAT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	(Sanz-Martin <i>et al.</i> , 2016a)
SLFTr F	CACCCAGGCAGATGAATCGGTGTGGA	Amplification of GLRG_05578 promoter region	This article
SLFTr R	AACTGAGCTTCCTTGCCGGGT	Amplification of GLRG_05578 promoter region	This article
CgSL2 qPCR F	GACGAGCAGAAGACGTATAGCCCG	qPCR GLRG_05578	This article
CgSL2 qPCR R	GCTTGGGTCAATTCAGCGAGACG	qPCR GLRG_05578	This article
CgH3 qPCR F	CGAGATCCGTCGCTACCAGA	qPCR <i>C. graminicola</i> Histone 3	(Krijger <i>et al.</i> , 2008)
CgH3 qPCR R	GGAGGTCGGAATTGAAGTCCT	qPCR <i>C. graminicola</i> Histone 3	(Krijger <i>et al.</i> , 2008)
CgITS2 F1.1	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG	qPCR <i>C. graminicola</i> ITS 2	(Weihmann <i>et al.</i> , 2016)
CgITS2 R1	TTACGGCAAGAGTCCCTC	qPCR <i>C. graminicola</i> ITS 2	(Weihmann <i>et al.</i> , 2016)
CgEF1 α F	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	qPCR <i>Zea mays</i> elongation factor 1 α	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
CgEF1 α R	ACATACCCACGCTTCAGATCCT	qPCR <i>Zea mays</i> elongation factor 1 α	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
Zm382 F	CCTGCTGGGAGAGCATGGAA	qPCR <i>Z. mays</i> GRMZM2G069382	This article
Zm382 R	GGGCTTCTGTCAGGATTGCTTTGA	qPCR <i>Z. mays</i> GRMZM2G069382	This article
Zm742 F	CCAACGACTAGAAGCCACTGTCC	qPCR <i>Z. mays</i> GRMZM2G061742	This article
Zm742 R	CTCGTCCAACAAGTCTCGGC	qPCR <i>Z. mays</i> GRMZM2G061742	This article

CHAPTER III

**Evolutionary and functional
characterization of *Colletotrichum
graminicola* effector CgEP3**

Abstract

The maize pathogen *Colletotrichum graminicola* is the causal agent of leaf anthracnose and stalk rot. *C. graminicola* secretes effector proteins that disable plant defense components and promote successful infection. In a previous genome-wide survey for *C. graminicola* effector proteins we identified CgEP3, a protein predicted to encode a secretion signal peptide, a partial nucleoside phosphorylase domain (NP), a highly basic C-terminal domain and is predicted to be nuclear localized. This protein has no similarity to previously described pathogenicity factors and there are no structurally similar proteins in other species of fungi. Sequence alignments revealed that the C-terminus is highly variable and bears only minimal similarity to other NP domain containing proteins, while the NP-like domain is highly conserved suggesting that it is subject to stronger purifying selection. Phylogenetic analysis suggests that CgEP3 is related to fungal NP enzymes but underwent profound structural changes in *C. graminicola*. Transcriptional profiling and live cell imaging show that CgEP3 is specifically expressed in conidia, appressoria and during early penetration, suggesting a role at these time points. Based on the in silico analysis and transcriptional profile, we hypothesized that CgEP3 is an effector that is localized to the plant nucleus with a role during pre-penetration and early stages of infection. CgEP3 null mutants had significantly reduced lesion size and biomass accumulation on maize leaves. Therefore, CgEP3 is an effector that contributes to virulence during the early stages of infection. It is also an example of effector evolution through the acquisition of new protein functions in an existing gene family.

Introduction

The members of the fungal genus *Colletotrichum* cause anthracnose disease in a wide range of plant hosts (Bailey & Jeger, 1978; Cannon *et al.*, 2012), and includes the economically important pathogen on maize (*Zea mays*) *C. graminicola* (Bergstrom & Nicholson, 1999; Munkvold, 2002; Cota *et al.*, 2012). Anthracnose is increasingly being recognized as a threat to food security worldwide (Munkvold, 2002; Fisher *et al.*, 2012; Kamenidou *et al.*, 2013; Sanz-Martín *et al.*, 2016b). This hemibiotrophic fungus enzymatically and mechanically breaches the outer plant surface using an appressorium that produces a biotrophic primary hypha. Primary hyphae are thicker, bulbous and grow thorough the intercellular spaces of the host and subsequently, switch to the growth of narrow secondary hyphae that kill host cells (Perfect *et al.*, 1999; Münch *et al.*, 2008; Kleemann *et al.*, 2008). The predicted secretomes of the sequenced *Colletotrichum* fungi are large and diverse, containing homologs of genes that encode known fungal pathogenicity effectors (O’Connell *et al.*, 2012). For instance, genes encoding members of the necrosis- and ethylene- inducing peptide (NEP) 1-like protein family were identified in *C. higginsianum* (Kleemann *et al.*, 2012) and subsequently in other *Colletotrichum* spp. (Baroncelli *et al.*, 2016). In *C. graminicola*, the fungalysin metalloprotease Cgfl has been shown to act as an effector, and Cgfl homologs were found in a wide diversity of different fungi (Sanz-Martín *et al.*, 2016a). Stephenson *et al.* (2000) identified CgDN3, a *C. gloeosporioides* gene predicted to encode a small secreted protein that is required for the successful establishment of this pathogen on *Stylosanthes guianensis* leaves. Interestingly, homologs of CgDN3 have also been reported in *C. higginsianum* and *C. orbiculare*, and its role as an effector in *C. higginsianum* was confirmed experimentally (Yoshino *et al.*, 2012; Kleemann *et al.*, 2012). *Colletotrichum* spp. also encode large repertoires of small, lineage-specific secreted candidates proteins (LSECs) that may act as effectors to manipulate host defenses and induce compatibility (O’Connell *et al.*, 2012; Gan *et al.*, 2013; Crouch *et al.*, 2014; Baroncelli *et al.*, 2016).

Effectors are small molecules that are often delivered to the apoplastic space and inside host cells during the colonization process. They target plant components needed for plant defense responses and act in many different ways, suppressing the host immune response or manipulating host cell physiology (Dodds & Rathjen, 2010; Doehlemann & Hemetsberger, 2013; Giraldo & Valent, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015). Several effectors are known to be translocated from the pathogen to the host plant cytoplasm and others subcellular organelles (Göhre & Robatzek, 2008; Khang *et al.*, 2010; Römer *et al.*, 2010; Irieda *et al.*, 2014). It has been shown that effectors of diverse phytopathogenic organisms are also delivered into the plant cell nucleus. Most of our knowledge of nuclear effectors is related to bacterial pathogenesis (Canonne & Rivas, 2012; Hicks & Galán, 2013; Escoll *et al.*, 2016; Büttner, 2016). However, other studies also have shown that effectors of nematodes, viruses and oomycetes can localize to host nuclear compartments (Lucy *et al.*, 2000; Caillaud *et al.*, 2008, 2012; Schornack *et al.*, 2010; Quentin *et al.*, 2013; Stam *et al.*, 2013). Once there, effectors manipulate host transcription or directly target essential nuclear host components for the benefit of the pathogen (Rivas & Genin, 2011). In contrast, less is known about fungal effectors with host nuclear localization (Kemen *et al.*, 2005; Redkar *et al.*, 2015; Petre *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2016). The Uf-RTP1 protein from the rust fungus *Uromyces fabae* was the first fungal protein for which localization within the host cytoplasm could be demonstrated directly. The protein is secreted by haustoria inside infected plant cells and is accumulated in plant nuclei, forming filaments inside the extra-haustorial matrix and the host cytoplasm (Kemen *et al.*, 2005, 2013). Furthermore, RTP1 homologs constitute a rust fungi-specific family of modular effector proteins, which also exhibit protease inhibitory activity (Pretsch *et al.*, 2013). The most recent example in fungi has been described by our group in the *C. graminicola*-maize pathosystem. CgEP1 is a highly basic protein which contains a signal peptide, a nuclear localization signal (NLS) and six nearly identical intragenic tandem repeats, consisting of basic and acidic regions that are predicted to fold into a bipolar helix structure. Functional characterization revealed that CgEP1 is essential for *C. graminicola* pathogenicity in different maize tissues, being necessary to penetrate the maize epidermis and required during the whole biotrophic stage of the infection. CgEP1 was

demonstrated to have DNA-binding capacity and is able to bind to hundreds of target sites in the maize genome, suggesting that CgEP1 interferes with the transcription of many host genes (Vargas *et al.*, 2016).

Previously, we performed a genome-wide survey to identify *C. graminicola* effector proteins that are predicted to encode a secretion signal and that have evidence of nuclear localization and/or DNA binding domains. We identified 164 putative effector proteins that are likely to target the host's nucleus, as they contain both secretion signal peptides and are predicted to be localized to the nucleus (Vargas *et al.*, 2016). In this manuscript we report the characterization of one putative effector, CgEP3, that was identified in this previous study. This gene encodes a small species specific protein of unknown function, that has a domain with similarity to the N-terminal region of nucleoside phosphorylase (NP) domains and a highly basic C-terminal domain. This protein has no similarity to previously described pathogenicity factors and there are no proteins with similar structure in other species. The gene is expressed during the early stages of anthracnose infection and strains lacking the gene show reduced lesion size and biomass accumulation in maize leaves, indicating that it plays a role in fungal virulence. Phylogenetic analysis shows that CgEP3 is related to a family of secreted NPs, providing an example of effector evolution through the acquisition of a new protein function.

Results

CgEP3 encodes two domains that are subject to asymmetric evolutionary pressure

Vargas *et al.* (Vargas *et al.*, 2016) identified 164 effector candidates encoded in the *C. graminicola* genome that are predicted to contain a secretion signal peptide and are also predicted to be nuclear localized. We selected one of these candidates for further characterization. The locus GLRG_00879 encodes a hypothetical protein (CgEP3) of 125 amino acids that has a predicted isoelectric point (pI) of 7.67 and a molecular weight of 13.87 kDa. A BLAST search of the protein to the PHI-Base database failed to identify

homologs to known effectors or other virulence factors. InterProScan and BLAST similarity searches revealed a bipartite structure. The N-terminal domain contains a signal peptide that overlaps with a region with similarity to NP domains, although the protein appears to lack the full-length NP domain that is found in other fungal proteins (**Figure 37a**). The C-terminal region has no similarity to any known functional domains, but does have similarity to proteins with NP domains but to a region outside of the NP and other characterized domains (**Figure 38**). Examination of the top ten BLAST hits to the NP-like domain revealed an average of 74.5% sequence identity, while the average sequence identity of the C-terminal domain is 50.2% (**Additional file 2, see digital version**). This indicates that the two domains are subject to asymmetric evolutionary pressures. The NP-like domain appears to have more conserved function reflected by the accumulation of fewer amino acid changes, while the C-terminal domain is less conserved and evolved more quickly.

Interestingly, the predicted isoelectric points (pI) of the two domains are extremely different. The pI of the N-terminal region is acidic (4.62), while the pI of the C-terminal region is highly basic (11.3). Proteins that interact with DNA such as histones and regulatory proteins often have pIs higher than 9 (Thomas & Travers, 2001; Marian *et al.*, 2003), thus suggesting a possible DNA binding role for the C-terminal domain (**Figure 37b**). The characteristic pattern of basic arginine residues in this part of the protein may be crucial in the interaction with DNA or the recognition of the target (**Figure 37b**).

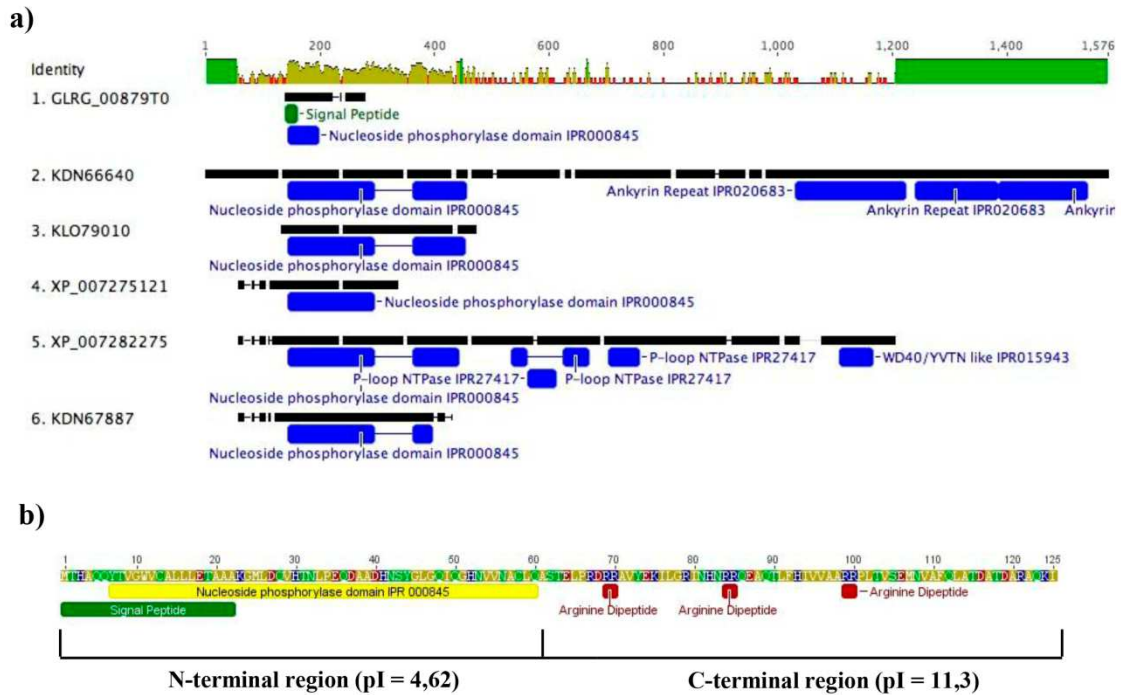


Figure 37. a) Multiple sequence alignment of CgEP3 to the five most similar proteins from GenBank identified using BLAST. Most of the five proteins have complete or nearly complete NP domains, while CgEP3 has only a fragment of the domain corresponding to the N-terminal region. **b) Schematic view of the CgEP3 protein.** The predicted protein has low molecular weight (13.87 kDa), and contains a predicted signal peptide and a nuclear localization signal. The protein has two clearly differentiated domains. The N-terminal region contains the secretion signal peptide overlapping with a partial NP domain, and the C-terminal region has three tandem repeats of two basic arginine residues separated by 13 amino acids. This part of the protein has a predicted isoelectric point (pI) of 11.3, which is highly basic and is often found in proteins that interact with DNA.

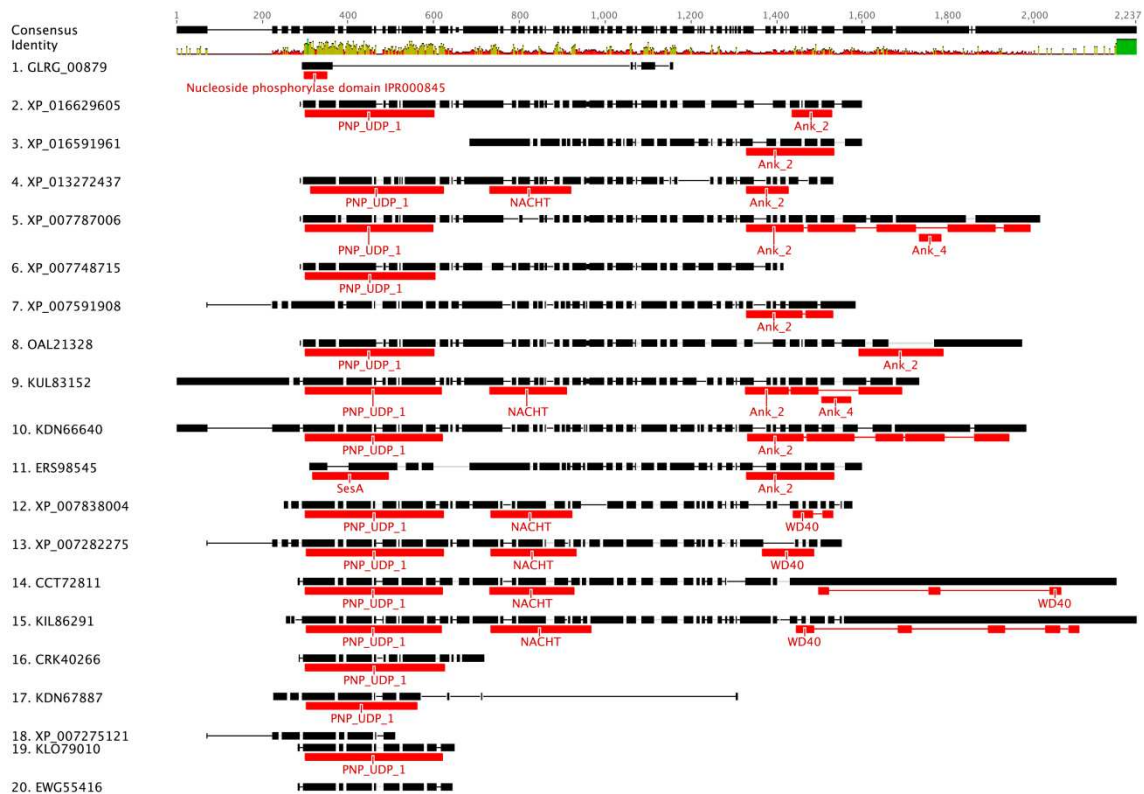


Figure 38. Top 10 BLAST hits to the N-terminal NP-like domain and to the C-terminal domain of CgEP3.

We attempted to model the tertiary structure of the mature protein using the Phyre2 server (Kelley & Sternberg, 2009), but failed to find any high confident alignments. A unique aspect of this protein is that removal of the signal peptide at the predicted cleavage site results in the elimination of 16 amino acid residues from the N terminus of the NP domain. Therefore, we performed a second search using the full length protein sequence including the signal peptide. This search revealed that 49 residues (40% of the sequence) localized in the N-terminal region were modeled with 97.8% confidence by aligning to the highest scoring template, a 5'-methylthioadenosine/*s*-adenosylhomocysteine nucleosidase from *A. thaliana*. No matches were found for the basic C-terminal region of the protein (**Figure 39**).

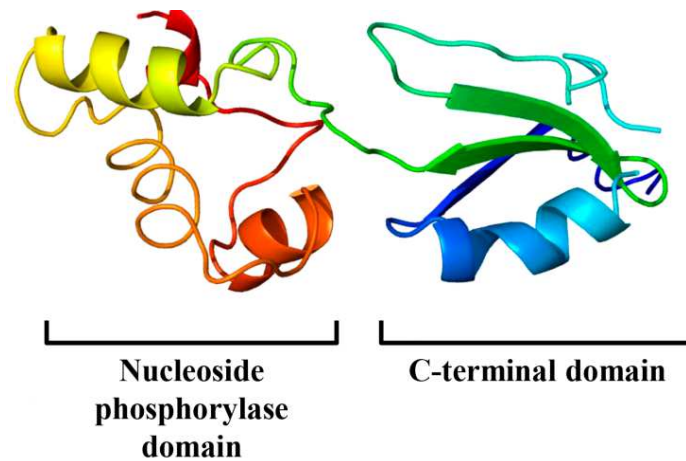


Figure 39. Predicted three-dimensional structure view of the CgEP3 protein. The protein structure prediction was made using the Phyre2 server and results showed six α -helix and two β -strands. The acidic N-terminal region was modeled at 90% confidence and the basic C-terminal region at 60% confidence.

We performed a BLASTP search to compare CgEP3 to the proteomes of other *C. graminicola* isolates previously sequenced by our group (Rech *et al.*, 2014), to determine the conservation level of CgEP3. We found CgEP3 homologs in all of the isolates, indicating that this protein is well conserved in *C. graminicola*. We constructed a phylogenetic tree of the 100 most similar proteins identified in a BLASTP search of the nr database. The 100 proteins were aligned and the region spanning the conserved NP domain was extracted for phylogenetic reconstruction (**Figure 40**). The phylogeny shows that CgEP3 clusters with sequences from other *Colletotrichum* spp., as well as species of the closely related genera *Verticillium* and *Fusarium*. We identified 13 proteins that, like CgEP3, encode a secretion signal peptide that overlaps the N-terminus of the NP domain. The signal peptide containing proteins are predominantly from *Aspergillus* spp., and all but one are found in a single clade of the phylogenetic tree. The phylogeny shows that several gene duplications and losses have occurred during the evolution of this gene family. The analysis is consistent with the hypothesis that CgEP3 is a descendant of a subfamily of secreted NPs which have been lost in many species of fungi, but maintained in *Aspergillus*, *Talaromyces* and *Emonsia parva*. In *C. graminicola* this gene underwent rapid evolution, changing the structure of the protein, as well as changing its function from that of an NP to that of a pathogenicity effector, as shown in this study.

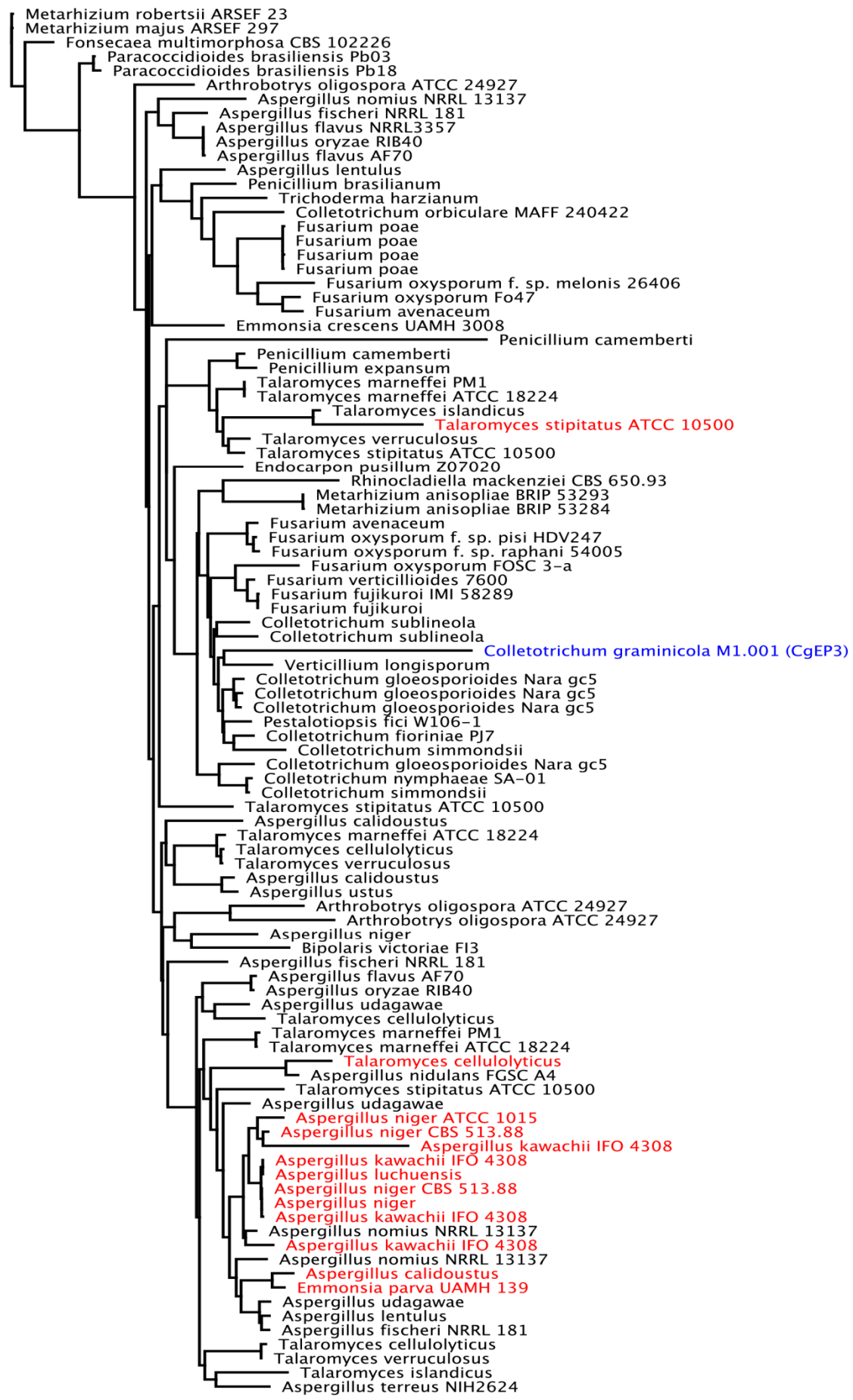


Figure 40. Phylogenetic analysis of CgEP3 homologs. A BLASTP search of the GenBank nr database was performed using CgEP3 as the query sequence and the 100 most similar proteins were retained for further analysis.

CgEP3 is expressed during the early stages of infection

C. graminicola starts its infection in maize leaves when asexual conidia germinate to form melanized appressoria at 12 hours post-infection (hpi). A penetration hypha emerging from the base of the appressorium breaks through the plant cuticle and cell wall and once inside, colonizes epidermal and mesophyll cells through bulbous primary hyphae, which expand and invaginate the host plasma membrane. This biotrophic stage of the infection remains for approximately 48 hpi, and is followed for a transition stage until 72 hpi, when secondary hyphae emerge from the tips of primary hyphae, invading adjacent cells and killing the host (Vargas *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012).

We performed a time-course gene expression analysis of the infection process using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). We found that *CgEP3* is strongly upregulated in ungerminated conidia and during the earliest stages of the infection (12 and 24 hpi), when the conidia are germinating to form appressoria that break the plant cuticle. As infection progresses to the biotrophic and necrotrophic stage, the expression level of *CgEP3* decreases. Also, low levels of expression were detected in saprophytic mycelium grown *in vitro* (**Figure 41a**). To provide more comprehensive gene expression profile of the *CgEP3* gene during the interaction with maize, we prepared a transcriptional fusion of the *CgEP3* promoter region and the *gfp* gene (*PCgEP3::gfp*) (**Figure 41b**). Confocal laser microscopy analysis was used to visualize *gfp* expression *in situ*. Using the *PCgEP3::gfp* strain, we detected GFP fluorescence in conidia and appressoria at 12 hpi in maize inoculated plants (**Figure 41c**). We also prepared a transcriptional fusion between the promoter region of the β -*tubulin* gene and the *gfp* gene. The β -*tubulin::gfp* strain enabled the visualization of appressoria (**Figure 41d**), as well as primary and secondary hyphae (data not shown). Together, these results demonstrate that the expression of *CgEP3* is specifically activated in conidia and appressoria during the early stages of the infection.

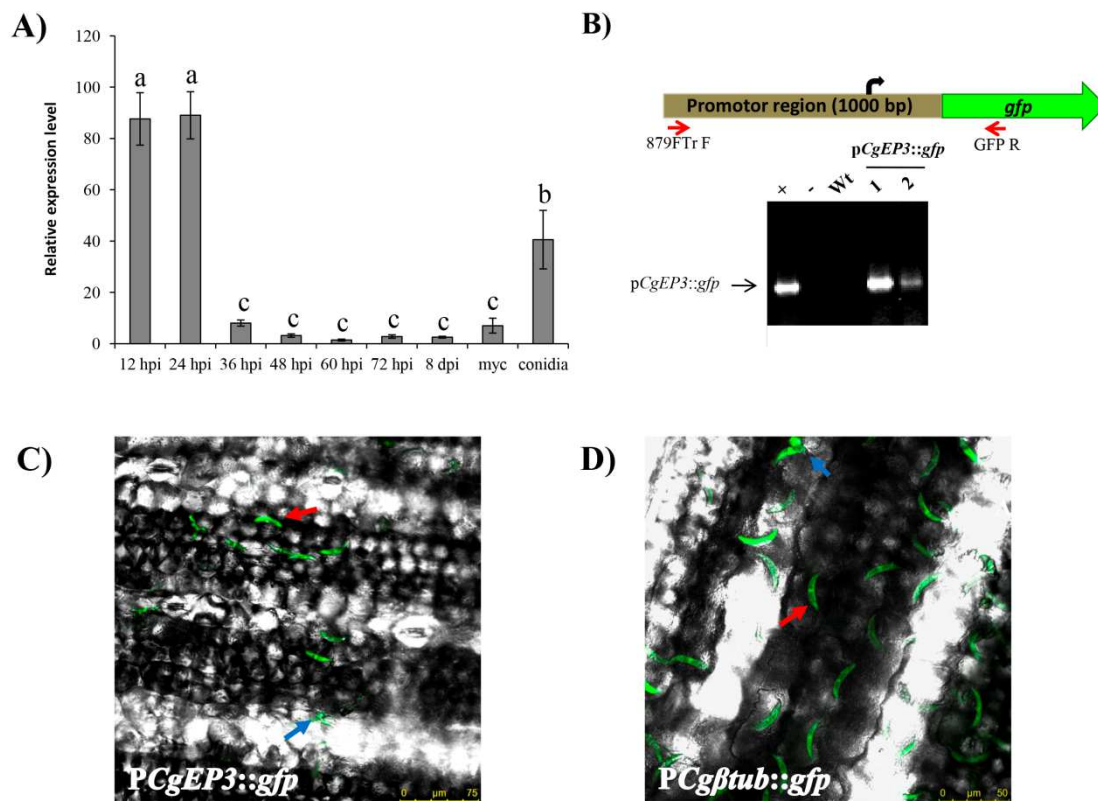


Figure 41. a) Quantitative real time PCR analysis of *CgEP3*. To determine the expression levels of *CgEP3*, a qRT-PCR assay was performed with infected maize leaves at different time-points, every 12 hours up to 72 hours post inoculation (hpi). Also, ungerminated conidia and saprophytic mycelium grown *in vitro* were tested. The results showed that *CgEP3* is expressed at early stages of infection (12-24 hpi) with a significant decrease at 36 hpi. The results were normalized to mean expression level of *C. graminicola* β -tubulin and histone 3. Bars represent the mean \pm SD of two independent biological repetitions. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.01$) as determined by a one-way ANOVA followed by a Tukey's HSD test. **b) Design of transcriptional fusions to study *CgEP3* promoter activation.** To generate *PCgEP3::gfp* transcriptional fusion construct, the gene promoter was predicted 1000 bp upstream of the start codon of the *CgEP3* gene. The fragment was PCR-amplified and cloned into the pKW3 plasmid, which contains a *gfp* cassette. The *C. graminicola* transformants obtained were confirmed by PCR. **c) GFP fluorescence was detected at 12 hpi in conidia and appressoria**, indicating that *CgEP3* is expressed during the early development of maize anthracnose. **d) An additional construct between the β -tubulin promoter and the *gfp* gene was made as positive control of the experiment.** Red arrows indicate conidia and blue arrows indicate appressoria. wt, wild-type strain; hpi, hours post-inoculation; myc, mycelia; cn, conidia.

CgEP3 is a novel class of pathogenicity factor

To further investigate the role of *CgEP3* during host infection, we prepared fungal strains in which the *CgEP3* coding sequence is replaced by a construct carrying an *hph* cassette and a *gfp* cassette (García-Pedrajas *et al.*, 2008b; Vargas *et al.*, 2016) (Figure

42a). Further, deletion strains expressed GFP in a constitutive way to facilitate subsequent microscopic analyses. Targeted replacement mutants were identified by PCR, and were further confirmed by RT-PCR (data not shown) and by Southern blot (**Figure 42b**) and by microscopic analysis (**Figure 42c**).

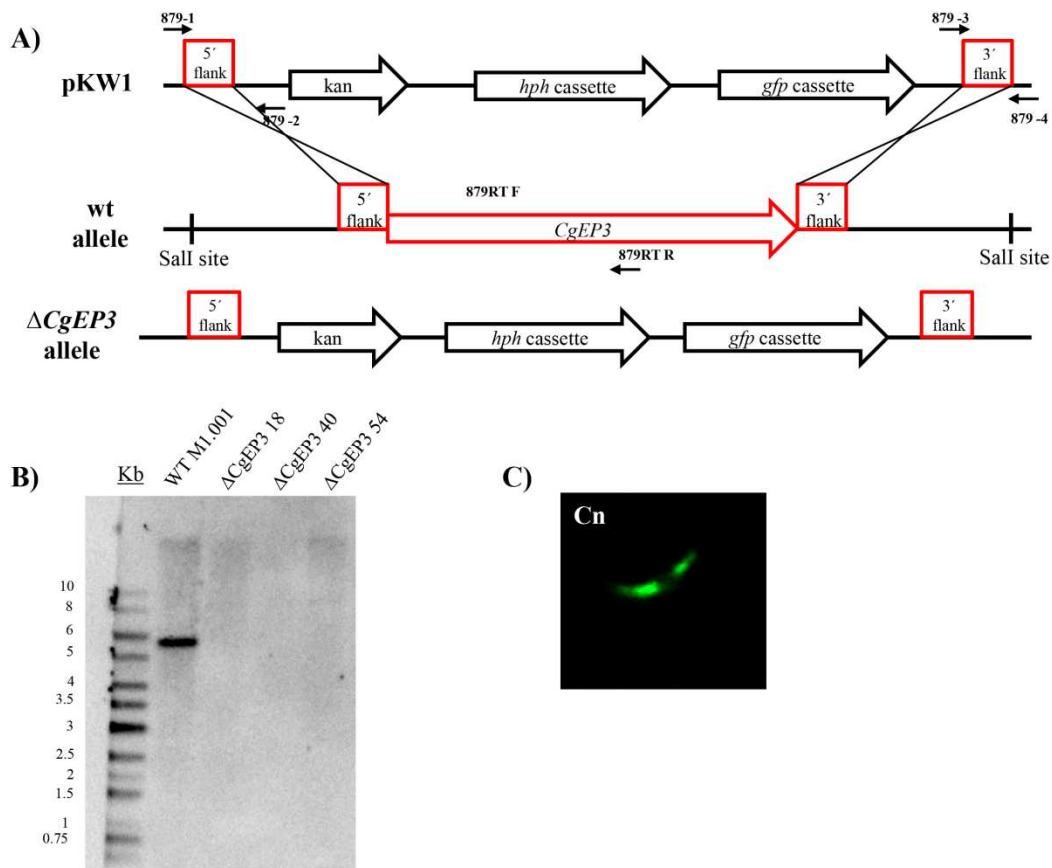


Figure 42. Development of gene knockout fungal strains. **a)** The construct to delete *CgEP3* was generated using a modified version of DelsGate method. The vector contains a hygromycin resistance cassette and a cassette for constitutive expression of *gfp*. Through homologous recombination events, the *CgEP3* gene was replaced by these cassettes. **b)** Fungal strains lacking the *CgEP3* gene were confirmed by Southern blot analysis using the internal region of the *CgEP3* gene as probe. Genomic DNA samples were digested with *Sall* before Southern hybridization. **c)** Conidia of the Δ *CgEP3* 40 transformant strain showing GFP fluorescence. wt, wild-type strain; cn, conidia.

To evaluate any pleiotropic phenotypes of *CgEP3*, we conducted an *in vitro* phenotypic characterization of the deletion mutants. We found no difference in growth and sporulation rates between the wild-type M1.001 (WT) strain and the deletion mutant strains (**Figure 43a-c**).

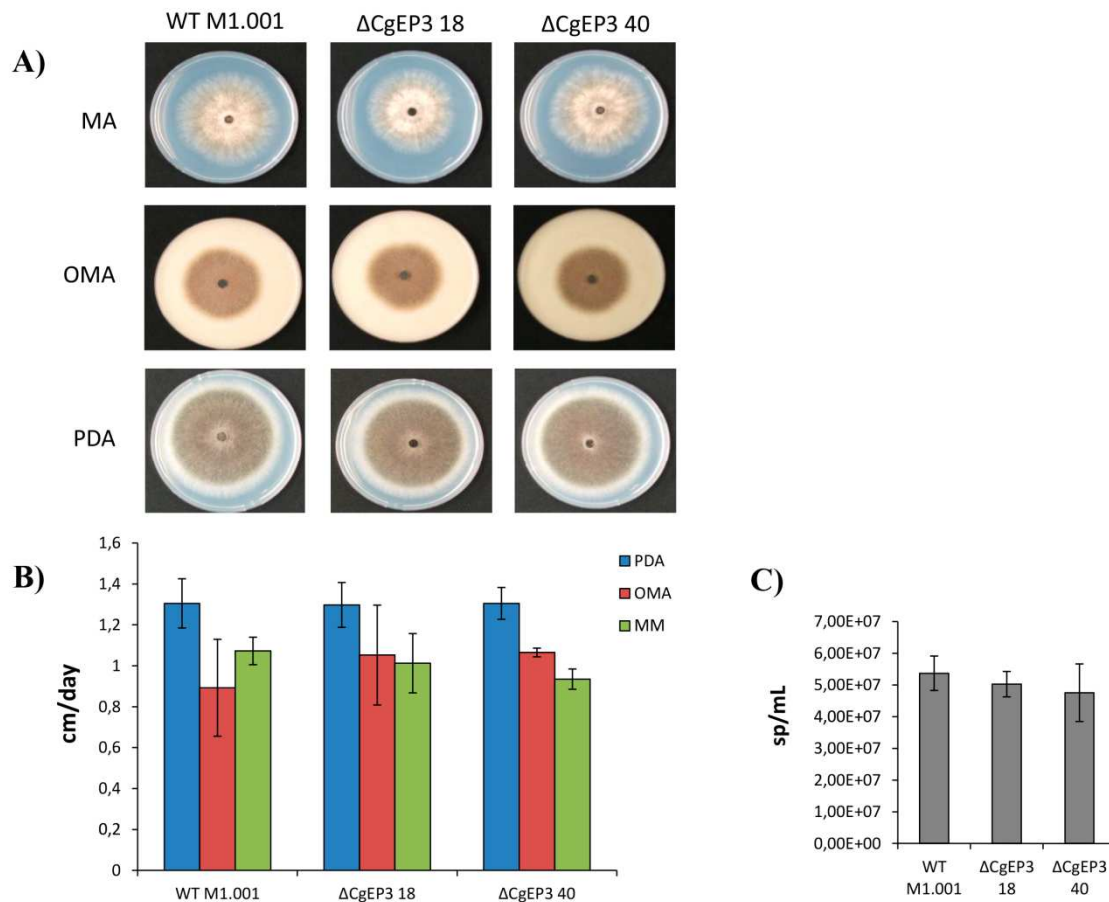


Figure 43. *In vitro* quantitative assays for the evaluation of mutant phenotypes. **a)** *CgEP3* null strains were grown during 6 days at 23° C in different solid media like minimum agar (MA), oatmeal agar (OA) or potato dextrose agar (PDA) to perform growth rate assays. **b)** Sporulation rate assay of the WT strain and the Δ *CgEP3* strains. Three independent replicates were performed for each experiment. Bars are \pm standard deviations

To determine whether *CgEP3* is involved in pathogenicity, spore suspensions of two independent transformants were employed for inoculation in maize leaves following the protocol previously described (Vargas *et al.*, 2012). Three days after inoculation, lesion sizes were evaluated. Each experiment was repeated at least three times. The results showed that knockout mutant strains exhibit reduced lesion sizes respect to the WT strain (**Figure 44a, b**). To quantify fungal colonization during infection of maize leaves, we compared the biomass accumulation of the Δ *CgEP3* strains *in planta* with the WT strain using qRT-PCR. At 72 hpi, fungal biomass was significantly reduced in

plants inoculated with the $\Delta CgEP3$ strains, indicating that CgEP3 is important for the colonization process of *C. graminicola* (Figure 44c).

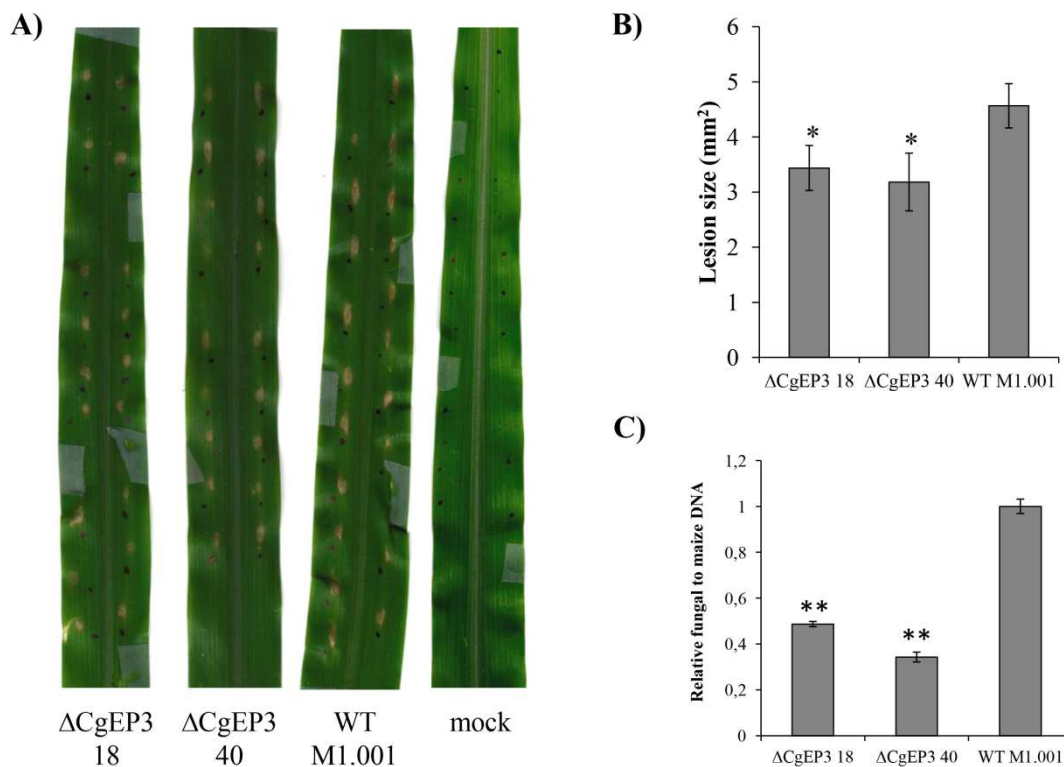


Figure 44. Infection assays of WT and $\Delta CgEP3$ strains on maize leaves. Pathogenicity assays were performed following the protocol previously described (Vargas *et al.*, 2012). **a, b)** Maize leaves were collected at 3 dpi and lesion sizes were measured using the image software Paint.NET 4.0.3 (dotPDN, LCC). Three independent experiments were performed. Bars are \pm standard deviations and different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$) according with two-sided Dunnett's multiple comparisons test. **c)** Fungal biomass of plants inoculated with the $\Delta CgEP3$ strains and the WT strain was assessed by qRT-PCR. Measurements were referred to the value obtained in WT strain inoculated tissues. Bars represent means \pm standard deviations of two independent biological samples. Bars with asterisks are statistically significantly different ($P < 0.01$) as determined by an unpaired *t* test.

Discussion

Like other plants pathogens, fungi secrete a variety of effector proteins that modulate plant innate immunity and allow the pathogen to infect and colonize the host plant (Kamoun, 2007). Nuclear-localized effectors have been described as the

'ultimate weapons' in the arsenal of pathogens, because they suppress the immune response at the source (Chaudhari *et al.*, 2014). They can re-program the plant cell transcriptional machinery, suppress the plant immune response and subsequently promote pathogen virulence. Despite their importance, few nuclear effectors from fungi have been experimentally verified. The only *Colletotrichum* protein that has been shown to function in the plant nucleus is CgEP1 (Vargas *et al.*, 2016). CgEP1 encodes a secreted protein with DNA-binding properties and plays an important role during the biotrophic stage of infection of *C. graminicola*, and is required for anthracnose development in leaves, stems and roots. In this work, we characterize another candidate, CgEP3. CgEP3 is predicted to be localized to the nucleus and contains a partial domain that typically binds to nucleosides. In addition, the pI of the C-terminal region is highly basic, which is characteristic of DNA binding proteins, further supporting the hypothesis that it is involved in DNA-protein interactions.

The N-terminal region of CgEP3 encodes a partial NP domain. NPs are enzymes that serve a key role in nucleoside catabolism, referred to as the salvage pathway. These pathways allow the cell to produce nucleotide monophosphates when the *de novo* synthesis pathway has been interrupted or is non-existent, providing means of surviving nutrient starvation and oxidative stress. Thus, in plants and microbes, the degradation reactions serve to use purine nucleotides as nutrient sources (Zrenner *et al.*, 2006; Werner & Witte, 2011). In bacteria and Microsporidia have been shown that nucleosidases are important for the virulence (Bao *et al.*, 2013; Alexander *et al.*, 2016). However, the function these enzymes may play in fungal-plant interactions is currently unknown. The NP-like domain of CgEP3 has similarity only to the N-terminal region of the NP domain of other fungal NPs and probably does not function as an NP. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that CgEP3 retains some NP functions. The relatively high sequence conservation in the NP-like domain shows that it is subject to purifying selection.

In contrast to the conserved NP-like domain, the C-terminal domain is highly variable and bears only minimal similarity to NP domain containing proteins. Thus, CgEP3 is subject to asymmetric selective pressures acting on it, having a conserved N-terminal domain and a variable C-terminal domain. Similar observations of uneven

patterns of diversification have been made for several polymorphic oomycete effector genes (Rehmany *et al.*, 2005; Kamoun, 2006; Win *et al.*, 2007). It has been shown that RxLR and CRN effectors have conserved N-terminal motifs for translocation into the host and highly diverse C-terminal domains (Whisson *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 2009; Schornack *et al.*, 2010). A similar pattern is also seen in our previously described nuclear effector CgEP1 (Vargas *et al.*, 2016). The ongoing change in the amino acid sequence of C-terminal region provides plant pathogens with high sequence diversity, which in turn enables the pathogen to evade detection while optimizing or maintaining virulence. Meanwhile, the more conserved N-terminal region may provide core functions such as subcellular localization or substrate recognition.

Effector evolution in pathogens represents a trade-off between escaping from detection and optimizing virulence. The large and diverse effector repertoires of pathogens suggest a strong evolutionary pressure for diversity, leading to accelerated evolution. How effector genes arise and evolve is poorly understood. It has been postulated that gene duplication followed by functional diversification contributes to the emergence of new effectors (Remigi *et al.*, 2011; Dutheil *et al.*, 2016). Sequence similarity searches revealed that CgEP3 has no similarity to previously described pathogenicity factors and there are no similar proteins in other species. However, it has similarity in its N-terminal region to NP enzymes, indicating that is likely a product of an ancient gene duplication event, followed by evolution to take on a new function. Functional diversification occurs either by subfunctionalization or by neofunctionalization. During subfunctionalization, the rate of evolution of the two gene copies that result from gene duplication is expected to be symmetrical (Innan & Kondrashov, 2010). Conversely, during neofunctionalization, one copy evolves faster and acquires a new function while the other maintains its original function (Remigi *et al.*, 2011). CgEP3 may be a product of a gene duplication followed by neofunctionalization, during which time the protein lost most of the NP domain and other domains that are typically found in NPs.

Thus, CgEP3 could be the second *C. graminicola* effector that has been shown to evolve by gene duplication followed by rapid evolution. Previously, we showed that CgEP1 is a paralog of another *C. graminicola* gene, GLRG_09337 (Vargas *et al.*, 2016).

Alternatively, CgEP3 may be the result of a change in ecological niche resulting in a change in selective pressure of some genes. This may permit relaxed selective pressure on the ancestral gene, permitting it to acquire a new function as an effector.

Gene expression analyses revealed that *CgEP3* is up-regulated during the early biotrophic phase (12 and 24 hpi), as well as in ungerminated conidia, suggesting that CgEP3 plays an essential role in the establishment of a compatible interaction with the plant. The early expression pattern of *CgEP3* during the anthracnose process has previously been observed in other effectors involved in the suppression or evasion of the early host immune response. *Colletotrichum higginsianum* secretes effectors through the appressorial penetration pore before the penetration peg is called into action (Kleemann *et al.*, 2012; Irieda *et al.*, 2014). A similar pattern was observed for several *C. orbiculare* proteins (Irieda *et al.*, 2014). Thus, pre-penetration effectors appear to be important in *Colletotrichum* for modulating the early immune response. Pre-penetration effectors have been described as “anesthetic agents”, which counteract pre-invasion host defenses and prepare the host cell for colonization, so that the subsequent penetration can be carried out with minimal resistance (Dou & Zhou, 2012). CgEP3 may act similarly, contributing to the suppression of pre-invasion and early-invasion host defenses. Additional transcriptional profiling experiments are planned, which will help understand how the plant responds to CgEP3 during the early stages of infection.

Bioinformatics and comparative genomics can help identify putative effector proteins, but functional analyses are needed to provide experimental evidence for their roles in plant disease. Very few *C. graminicola* effectors have been functionally characterized so far (Albarouki *et al.*, 2014; Sanz-Martín *et al.*, 2016a; Vargas *et al.*, 2016). In this study, we provide experimental evidence, showing that CgEP3 is a novel class of fungal effector that contributes to *C. graminicola* pathogenesis, as deletion mutants were reduced in virulence and biomass accumulation during infection of maize leaves.

The understanding of how the effector proteins change the host plant physiology to allow infection, has become one of the major research topics in the field of plant

phytopathology (Hann *et al.*, 2012; Yi & Valent, 2013). Because effectors usually have specific functions and are unique to pathogens, understanding how they regulate plant disease responses can help to identify targets for fungicide development. In addition, knowledge about effectors can be exploited in crop breeding programs as way to select for resistant germplasm and improve crop protection (Pavan *et al.*, 2009; Gawehns *et al.*, 2013; Dangl *et al.*, 2013; Vleeshouwers & Oliver, 2014). As CgEP3 is unique to *C. graminicola*, further research to study its mechanism of action could lead to the development of disease specific control measures. Future work will investigate the localization of CgEP3 in the host cells, and the identification of the *in planta* targeting which will be crucial to fully understand the function of this effector.

Material and methods

Taxonomic distribution and phylogenetic analyses

To identify CgEP3 homologs in the *Colletotrichum* spp., we performed a BLAST search against nine complete proteomes available at the JGI fungal Gene Catalog. The presence of CgEP3 homologs in other fungi was assessed using BLAST searches of the GenBank non-redundant protein sequence (nr) database with an e-value cutoff of $1e^{-10}$, without low complexity filter. The 100 most similar proteins from the BLAST search of the nr database were aligned using MAFFT version 7 (Katoh *et al.*, 2002b), and phylogenetic trees were built by means of PhyML (Guindon *et al.*, 2010).

Prediction of protein structure and modeling

The signal peptide and cleavage site were identified with SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Nuclear localization was predicted using Wolf-PSORT (Horton *et al.*, 2007) and Euk-mPLoc 2.0 (Chou & Shen, 2010). InterProScan was used to identify the protein domains and protein structure modeling was performed with the Phyre2 server (Kelley & Sternberg, 2009).

Plant and fungus cultivation, inoculation procedure

A derivative of the susceptible *Zea mays* inbred line Mo940 was grown in conical tubes for three weeks (V3 developmental stage) at 27°C with cycles of ~16 hours of light per 24 hours. *C. graminicola* M1.001 strain was grown for 14 days on potato dextrose agar (PDA), minimal medium (MM) or oatmeal agar (OMA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) in Petri dishes at 23°C under constant white light. To grow liquid cultures, 25 mL of liquid potato dextrose broth (PDB) (Difco) medium were inoculated with 3 agar plugs of PDA cultures, and incubated for 4 days at 25°C, with 150 rpm shaking.

Pathogenicity assays were performed by placing plants horizontally on a wet paper towel in large trays. Conidia were filtered on Miracloth (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), washed three times in H₂O and inoculated in drops of 7.5 µL at both sides of the mid rib at 3×10^5 sp/mL. Inoculated leaves were incubated for up to 3 days at 25°C, with 16 hours of light per 24 hours. Three independent pathogenicity assays were performed.

Effector candidate gene expression by quantitative real time PCR

Plant leaves were harvested after inoculation, and ground in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using a SV Total RNA Isolation System kit (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's instructions. RNA was quantified on a NanoDrop ND_1000 (Thermo Scientific). The first-strand cDNA was synthesized using PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions contained 3.5 µL of 1X KAPA SYBR® Green qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), 1 µL of 500 nM primers and 500 ng of cDNA. Reactions were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 95°C for 5 minutes; 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 65°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds; then 95°C for 10 seconds; 65°C for 15 seconds followed by a progressive increase in temperature at 0.11°C/second up to 95°C to obtain the melting curve. The *C. graminicola* histone *H3* gene was used as a control. The expression of *CgEP3* gene

relative to the Ct values of the control gene was determined using the StepOne™ software (version 2.2.2, Applied Biosystems). Fungal cultures were grown *in vitro* for 4 days and harvested immediately. Standard deviation was calculated from two independent biological experiments.

Gene deletion and construction of PCgEP3::gfp fusion

The *CgEP3* gene deletion construct was prepared using the DelsGate method (García-Pedrajas *et al.*, 2008b). The 5' and 3' regions flanking the *CgEP3* coding sequence were amplified by PCR using the primer pairs 879-1 - 879-2 and 879-3 - 879-4. The pKW1 vector, which contains a *gfp* cassette and a hygromycin B phosphotransferase cassette (*hph*) (Sanz-Martín *et al.*, 2016a; Vargas *et al.*, 2016), was used as the pDONR vector for cloning the *CgEP3* flanking regions using Gateway technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The construct was further confirmed by sequencing. The construct was linearized with *SceI* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and transformed into WT strain protoplasts, as previously described (Thon *et al.*, 2000; Sukno *et al.*, 2008a). Transformants containing the desired gene deletion were identified by PCR amplification of the internal region using two sets of PCR primers (**Table 4**).

To construct the PCgEP3::gfp transcriptional fusion, the *CgEP3* gene promoter was predicted to be 1 kb upstream of the *CgEP3* start codon. Primers 879FTr F and 879FTr R (**Table 4**) were designed to amplify this region from genomic DNA. The fragment was cloned using pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen), confirmed by sequencing and recombined into the pKW3 destination vector, which contains a *gfp* cassette (Vargas *et al.*, 2016). The construct was confirmed by sequencing, and PCgEP3::gfp transformants were confirmed by PCR with the primers 879FTr F and GFP R. A construct fusing the β -*tubulin* promoter to the *gfp* coding sequence was prepared to visualize the WT strain infection process. The promoter region of this endogenous gene was identified and PCR amplified using the primers TubFus1 and TubFus2, following the same strategy (**Table 4**).

Genomic DNA extraction and Southern blot analysis

Genomic DNA (gDNA) was extracted from mycelium using the protocol adapted from (Baek & Kenerley, 1998b). For Southern blot analysis, 10 µg of genomic DNA was digested with *SalI* (Roche Diagnostics), separated in 0.8% (w/v) agarose gel, denatured and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham HyBond-N, GE-HealthCare). A DIG dUTP labeled probe (the internal region of the *CgEP3* coding sequence) was generated by PCR using a DIG DNA labeling kit (Roche Diagnostics), the primers 879RT F and 879RT R and gDNA of the WT strain as template. The membranes were hybridized and washed under high-stringency as described by Sabrook and Russell (2001).

Quantification of fungal biomass

Relative quantification of fungal DNA in infected tissue samples was assessed by qRT-PCR. Maize leaves infected with *C. graminicola* strains were harvested at 72 hpi and lesion samples were excised with a 5 mm diameter cork borer. The leaf material was frozen in liquid nitrogen, ground to a powder, and DNA was extracted using a CTAB-based protocol (Irfan *et al.*, 2013). Fungal biomass was estimated as the relative quantity of *C. graminicola* DNA normalized to an endogenous control of *Z. mays* DNA, using the cycle threshold (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The qRT-PCR components and cycling conditions were as described above, except that 10 ng of genomic DNA was used as template for the reaction. Fungal DNA was detected using the internal transcriber spacer 2 (ITS2) of the ribosomal RNA-coding DNA cluster (rDNA) (Weihmann *et al.*, 2016), with the primers CgITS2 F1.1 and CgITS2 R1 (**Table 4**). To normalize differences in DNA templates, the maize endogenous gene elongation factor 1 alpha *EF1α* (Lin *et al.*, 2014) was amplified using the primers EF1α F and EF1α R (**Table 4**). Genomic DNA from mock inoculated maize plants was used as a negative control to create the standard curves. Two biological replicates were performed and the assays were evaluated two times for each replicate. Calculations and subsequent statistical analyses were performed using StepOne™ software (version 2.2.2, Applied Biosystems), Microsoft Office 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and Statistix 8 (Analytical software, FL, USA).

Microscopy and image processing

Confocal images were taken on a TCS/SP2 Leica laser scanning spectral confocal microscope (Leica, Bensheim, Germany). Excitation was provided by an argon laser at 488 nm and GFP fluorescence was detected at 490-520 nm (Sanz-Martín *et al.*, 2016a). A range of 595-680 nm was used to eliminate plant autofluorescence. Projections were generated from adjusted individual channels in the image stacks using the Leica Confocal Software.

Supplementary material

Table 4. List of primers used in the study.

Primer name	Sequence 5'-3'	Description	Reference
879-1	TAGGGATAACAGGGTATTATCGCCGAAT CCACACGCCT	Amplification of 5' flanking region of GLRG_00879	This article
879-2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTAACGAAGGGCTCTAAC	Amplification of 5' flanking region of GLRG_00879	This article
879-3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTAGCAGATCCGCGGGCT	Amplification of 3' flanking region of GLRG_00879	This article
879-4	ATTACCCTGTTATCCCTATGAACGCTATC TCGGCAGGCT	Amplification of 3' flanking region of GLRG_00879	This article
879RT F	GTTAATTAACCTGAATATACAATGACCC	GLRG_00879 RT-PCR	This article
879RT R	CTCATGACGATCTTTTGGCCCGGGCG	GLRG_00879 RT-PCR	This article
CTub F	CAGTCCCTTGGGCGGCACAG	<i>C. graminicola</i> β -Tubuline RT-PCR	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
CTub R	CCCGGGGCAATTGACGCC	<i>C. graminicola</i> β -Tubuline RT-PCR	(Vargas <i>et al.</i> , 2016)
879KO F	GGTCTTTGGTTACGGACGGGGA	Confirmation of deleted clones	This article
879KO R	GGCTTGATCGCTCTGGTAGC	Confirmation of deleted clones	This article
HYG F	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG	Amplification of <i>hph</i> cassette	This article
HYG R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCT	Amplification of <i>hph</i> cassette	This article
GFP R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	Amplification of <i>GFP</i> cassette	This article
TubFus F	CCCCTACTCAAGACAGGTGGT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	(Sanz- Martín <i>et al.</i> , 2016a)
TubFus R	CACCAGCTTCTGCCCCACGGTTAT	<i>C. graminicola</i> β -tubuline transcriptional fusion	(Sanz- Martín <i>et</i>

			<i>al.</i> , 2016a)
879FTr F	CACCATCGCCGATACCACACGCCT	Amplification of GLRG_00879 promoter region	This article
879FTr R	TCAATAGTCGAAGGGCTCTAACG	Amplification of GLRG_00879 promoter region	This article
Cg879 qPCR F	GCCAGATCCAGGGACATAAC	qPCR GLRG_00879	This article
Cg879 qPCR R	TCGTCGGTTGTGATTGATTCT	qPCR GLRG_00879	This article
CgH3 qPCR F	CGAGATCCGTCGCTACCAGA	qPCR <i>C. graminicola</i> Histone 3	(Krijger <i>et al.</i> , 2008)
CgH3 qPCR R	GGAGGTCGGAAGTGAAGTCCT	qPCR <i>C. graminicola</i> Histone 3	(Krijger <i>et al.</i> , 2008)
CgITS2 F1.1	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG	qPCR <i>C. graminicola</i> ITS 2	(Weihmann <i>et al.</i> , 2016)
CgITS2 R1	TTACGGCAAGAGTCCCTC	qPCR <i>C. graminicola</i> ITS 2	(Weihmann <i>et al.</i> , 2016)
CgEF1 α F	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	qPCR <i>Zea mays</i> elongation factor 1 α	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
CgEF1 α R	ACATACCCACGCTTCAGATCCT	qPCR <i>Zea mays</i> elongation factor 1 α	(Lin <i>et al.</i> , 2014)

CONCLUSIONS

1. The genome of the filamentous fungus *Colletotrichum graminicola* contains two genes coding for proteases involved in pathogenicity, a fungalysin zinc-metalloprotease named *Cgfl* and a subtilisin protease named *CPLS* (*Colletotrichum* plant-like subtilisin).
2. *Cgfl* is a member of the M36 fungalysin family and contains a signal peptide, a propeptide and a peptidase unit, which includes the conserved HEXXH motif implicated in catalytic activity. *Cgfl* is evolutionarily conserved in fungi and is present in other members of the Sordariomycetes. It is a single-copy gene but phylogenetic analyses show that ancient duplications and gene losses have occurred during its evolution.
3. Transcriptional profiling obtained by qRT-PCR analysis and observation of maize leaves inoculated with a strain expressing a *Cgfl* promoter-GFP fusion construct indicate that *Cgfl* is expressed specifically *in planta* during the biotrophic stage of the infection process. Furthermore, no expression was detected during *in vitro* growth.
4. *Cgfl* deletion mutants produced reduced lesion size on maize leaves, showing that it is involved in virulence. Roots infected with a *Cgfl* null mutant showed significantly less colonization of the cortex. Therefore, *Cgfl* has a role in virulence on both maize leaves and roots.
5. *Cgfl* null mutants show less endoproteolytic activity during *in vitro* growth in maize leaf extract medium. Furthermore, maize plants inoculated with *Cgfl* null mutants show increased chitinase activity than maize plants inoculated with the wild-type strain. These results are consistent with the hypothesis that *Cgfl* acts as chitinase degrading protease. Phylogenetic analysis and transcriptional profiling show that *C. graminicola* encodes two LysM domain-containing homologs of Ecp6, suggesting that this fungus employs both *Cgfl*-mediated and LysM protein-mediated strategies to control chitin signaling.
6. *CPLS* is a plant S8A subtilisin-like protease transferred by an ancient HGT event from plants to a *Colletotrichum* ancestor and is present in all *Colletotrichum spp.* with available genomes. Furthermore, *CPLS* homologs are present in only one other fungal genus, *Diaporthe*, a member of the Sordariomycetes and relatively closely related to *Colletotrichum*.
7. *CPLS* expression starts early during the infection process, reaching a maximum level at 48 hpi and progressively decreasing until 96 hpi.
8. Pathogenicity assays using null mutants resulted in larger lesions at 96 hpi, consistent with a hypervirulent phenotype. In contrast, no differences in virulence were seen during root infection. Thus, *CPLS* has a role in virulence on leaves but not in

roots. Furthermore, foliar lesions at 96 hpi have reduced fungal biomass accumulation, suggesting that CPLS is necessary for successful host colonization.

9. CPLS suppresses the expression of two maize genes that encode NLR immune receptors involved in signaling and programmed cell death processes during the biotrophic stage of the infection, suggesting that this protease may play a role in the modulation of host immunity. However, more research is necessary, especially the identification and localization of the *in vivo* substrate will help to understand the function of CPLS in the plant.

10. The *CgEP3* gene encodes a novel class of effector protein with two clearly differentiated domains, that are subject to asymmetric evolutionary pressure.

11. *CgEP3* is strongly upregulated during the earliest stages of the infection and is necessary for the pathogenicity of *C. graminicola*.

1. El genoma del hongo filamentoso *Colletotrichum graminicola* contiene dos genes que codifican proteasas implicadas en patogenicidad, una metaloproteasa fungalisina de tipo zinc denominada *Cgfl* y una proteasa subtilisina denominada *CPLS* (*Colletotrichum* plant-like subtilisin).
2. *Cgfl* es un miembro de la familia M36 de las fungalisinas y contiene un péptido señal, un propéptido y una unidad peptidasa que incluye el motivo conservado HEXXH implicado en la actividad catalítica. *Cgfl* se encuentra evolutivamente conservado en los hongos y está presente en otros miembros de los Sordariomicetos. Es un gen de copia única pero los análisis filogenéticos demuestran que ha sufrido duplicaciones y pérdidas durante su evolución.
3. El perfil transcripcional obtenido mediante análisis de qRT-PCR y observación de hojas de maíz inoculadas con una cepa que expresa la construcción de fusión entre el promotor de *Cgfl* y GFP, indica que *Cgfl* se expresa específicamente *in planta* durante la etapa biotrófica del proceso de infección. Además, no se detecta expresión durante su crecimiento *in vitro*.
4. Los mutantes delecionados en *Cgfl* producen lesiones reducidas en las hojas de maíz, lo que demuestra su implicación en virulencia. Las raíces infectadas con los mutantes nulos de *Cgfl* muestran una reducción significativa en su colonización del córtex. Por lo tanto, *Cgfl* posee un papel en la virulencia tanto en hojas como en raíces.
5. Los mutantes nulos de *Cgfl* muestran menos actividad endoproteolítica durante su crecimiento *in vitro* en medio de extracto de hoja de maíz. Además, plantas de maíz inoculadas con los mutantes nulos de *Cgfl* muestran una mayor actividad quitinasa que plantas inoculadas con la cepa silvestre. Estos resultados son consistentes con la hipótesis que sugiere que *Cgfl* actúa como una proteasa degradadora de quitinasas. Análisis filogenéticos y transcripcionales muestran que *C. graminicola* posee dos homólogos de Ecp6 con dominios LysM, lo que sugiere que este hongo emplea tanto la *Cgfl* como proteínas de tipo LysM para combatir la inmunidad mediada por quitina del huésped.
6. *CPLS* es una proteasa de tipo subtilisina S8A de plantas transferida por un antiguo evento de HGT a un ancestro del género *Colletotrichum* y se encuentra presente en todas las especies de *Colletotrichum* con genomas disponibles. Además, los homólogos de *CPLS* se encuentran presentes únicamente en otro género fúngico, *Diaporthe*, un miembro de los Sordariomicetos relativamente cercano a *Colletotrichum*.
7. La expresión de *CPLS* comienza temprano durante el proceso de infección, alcanzando un nivel máximo a las 48 hpi y posteriormente disminuye hasta las 96 hpi.
8. Los ensayos de patogenicidad en hoja de maíz con mutantes nulos de *CPLS* mostraron grandes lesiones a 96 hpi, consistentes con un fenotipo de hipervirulencia.

Por el contrario, no se observaron diferencias en la virulencia durante la infección en raíz. De esta forma, CPLS juega un papel en virulencia en las hojas pero no en las raíces. Además, las lesiones foliares a 96 hpi mostraron una reducida acumulación de biomasa fúngica, lo cual sugiere que CPLS es necesaria para colonizar con éxito el hospedador.

9. CPLS suprime la expresión de dos genes de maíz que codifican receptores inmunes de tipo NLR implicados en procesos de señalización y muerte celular programada durante la etapa biotrófica de la infección. Esto sugiere que esta proteasa quizá juegue un papel en la modulación de la inmunidad del huésped. Sin embargo, se necesita una investigación más completa. La identificación y localización *in vivo* del sustrato ayudará a determinar la función de CPLS en la planta.

10. El gen *CgEP3* codifica una nueva clase de proteína efectora que posee dos dominios claramente diferenciados, y sometidos a presión evolutiva asimétrica.

11. La expresión del gen *CgEP3* se produce durante las etapas más tempranas de la infección y es necesaria para la patogenicidad de *C. graminicola*.

APPENDIX.

MATERIALS AND METHODS

1. Reactivos

1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos utilizados en este estudio fueron obtenidos de Difco (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), GE Healthcare (Little Chalfont, UK), Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Merck (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), Panreac Applichem (ITW Reagents, Darmstadt, Alemania), Fluka (Sigma-Aldrich) y Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

1.2. Soluciones y tampones

Las soluciones estándar y los tampones fueron preparados siguiendo las indicaciones de (Sambrook & Russell, 2001). Los tampones especiales están nombrados en los apartados de los métodos correspondientes. Todas las soluciones fueron autoclavadas durante 20 minutos a 121°C antes de su utilización. Las soluciones sensibles al calor fueron esterilizadas mediante filtración (tamaño de poro 0,22 µm, Merck Millipore).

1.3. Enzimas

Las enzimas de restricción utilizadas en este estudio fueron compradas a Takara Bio-Clontech (Otsu, Shiga, Japón) y Roche Diagnostics. Las enzimas de restricción *PacI* y *Nt.BbvCI* fueron compradas a New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Las DNA polimerasas fueron obtenidas de Biotools (Madrid, España). Para la degradación enzimática del ARN, se usó la RNasa A (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La degradación enzimática de las paredes celulares fúngicas fue realizada usando la enzima lítica de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich).

1.4. Kits comerciales

Para la purificación de los productos de PCR, plásmidos y la elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa se utilizó el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel (Duren, Alemania). El aislamiento y purificación del ADN plasmídico de cultivos bacterianos se llevó a cabo usando el kit NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel. El kit pENTR-D/TOPO fue provisto por Invitrogen y fue utilizado para la

obtención de las fusiones transcripcionales de los distintos genes. Para el marcaje de los productos de PCR con digoxigenina, que se emplearon posteriormente como sondas, se utilizó el kit DIG DNA Labeled Mix de Roche Diagnostics. Los kits especiales para experimentos específicos han sido descritos en cada respectivo apartado del método.

Como marcadores de peso molecular utilizados en la separación electroforética de fragmentos de ADN en geles de agarosa se usó 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogen en la mayoría de experimentos. El marcador 1 Kb de Biotools se empleó en los experimentos Southern blot (**Figura 37**).

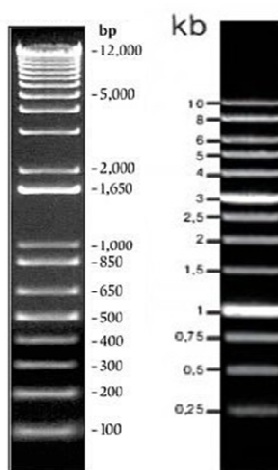


Figura 45: Marcadores de peso molecular. En este trabajo se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular. “1 Kb plus DNA ladder” (izquierda; Invitrogen) y “1 Kb DNA ladder” (derecha; Biotools).

2. Medios de cultivo

2.1. Medios para crecimiento y cultivo celular

Para el cultivo de microorganismos se utilizaron los medios descritos en la **Tabla 5**. Todos los medios fueron autoclavados a 121°C durante 20 minutos antes de usarlos, salvo excepciones que se detallan en cada experimento.

Appendix. Materials and Methods

Nombre	Composición	Notas
Potato Dextrose Agar (PDA)	Potato Dextrose Agar al 2,4% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio Luria-Bertani (LB)	Extracto de levadura al 1% (p/V) (Bacto Yeast Extract, Difco) Bactotripton a al 1% (p/V) (Bacto Triptone, Difco) Cloruro de sodio al 1% (p/V) Bacto agar al 2% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio de regeneración	Sacarosa 1 M Extracto de levadura al 0,1% (p/V) Hidrolizado de caseína al 0,05% (p/V) Hidrolizado ácido de caseína al 0,05% (p/V) Bacto agar al 1,5% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio Potato Dextrose Broth (PDB)	Potato Dextrose Broth al 2,4% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio Fries (-Agar)	Sacarosa al 3% (p/V) Tartrato de amonio a 0,5% (p/V) Nitrato de amonio al 0,1% (p/V) Fosfato de potasio monobásico al 0,1% (p/V) Sulfato de magnesio heptahidratado al 0,048% (p/V) Cloruro de sodio al 0,1% (p/V) Cloruro de calcio al 0,013% (p/V) Extracto de levadura al 0,1% (p/V) Bacto agar al 2% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio Mínimo (-Agar)	Sacarosa al 3% (p/V) Tartrato de amonio a 0,5% (p/V) Nitrato de amonio al 0,1% (p/V)	En H ₂ O destilada

	<p>Fosfato de potasio monobásico al 0,1% (p/V)</p> <p>Sulfato de magnesio heptahidratado al 0,048% (p/V)</p> <p>Cloruro de sodio al 0,1% (p/V)</p> <p>Cloruro de calcio al 0,013% (p/V)</p> <p>Bacto agar al 2% (p/v)</p>	
Medio Agar agua	Bacto agar al 2,5% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio Oatmeal Agar	Oatmeal agar (Difco) al 14% (p/V)	En H ₂ O destilada
Medio extracto de hoja de maíz	<p>110 g de hojas de maíz de unas 3 semanas de edad</p> <p>Calentar a 65°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas de la planta</p>	<p>En 300 mL de tampón fosfato de potasio 10 mM pH=7</p>

Tabla 5: Medios de cultivo para crecimiento de microorganismos.

2.2. Cultivo de *Escherichia coli*

Las bacterias *E. coli* fueron crecidas en medio líquido LB (Luria-Bertani) a 37°C, con agitación a 250 r.p.m. Los distintos antibióticos utilizados para las diferentes cepas de *E. coli* están descritos en la **Tabla 6**. Los stocks de glicerol de cada uno de los cultivos fueron preparados añadiendo glicerol 25% (V/V) y se guardaron posteriormente a -80°C.

Antibiótico	Concentración final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	100
Kanamicina (Kan)	50
Cloranfenicol (Clr)	100

Tabla 6: Antibióticos usados para *E. coli* y su concentración de trabajo.

2.3. Determinación de la densidad celular de los cultivos bacterianos

La densidad celular de los cultivos líquidos bacterianos fue determinada mediante un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer (Hamburgo, Alemania) a 600nm (DO_{600nm}). Para asegurar una dependencia lineal en el cultivo, se realizaron diluciones adecuadas en valores por debajo de 0,8. Como valor de referencia se usó el DO_{600nm} del medio líquido sin crecimiento bacteriano. En *E. coli* el valor DO_{600nm} de uno corresponde aproximadamente a 1×10^9 células bacterianas.

2.4. Cultivo de *C. graminicola*

Las cepas de *C. graminicola* se crecieron en medio sólido a 23°C, bajo iluminación blanca continua. Para los cultivos rutinarios en medio líquido se utilizó medio PDB o Fries (Vaillancourt and Hanau, 1992). Las condiciones de cultivo fueron 25°C, en agitación continua a 150 r.p.m. y luz constante durante 3-5 días.

2.5. Almacenamiento de *C. graminicola* en sílica gel

Las diferentes cepas de *C. graminicola* generadas en este estudio se conservaron a largo plazo en sílica gel, con un diámetro de partícula de 1-3 mm (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), previamente esterilizada a 121 °C durante 24 horas en horno y contenida en tubos crioviales con tapa de rosca Wheaton de 8 mL (VWR, Radnor, PA, USA). Estos tubos fueron guardados a -80°C para su preservación a largo plazo. Brevemente, las cepas de *C. graminicola* que se deseaban conservar fueron crecidas primeramente en placas de PDA a 23°C durante 1-2 semanas, bajo iluminación constante. Es conveniente no utilizar placas crecidas durante más de 2 semanas. Posteriormente, se añadieron 2-3 mL de leche desnatada (Merck) al 7,5% (p/V), previamente esterilizada, y se frotó suavemente la superficie del micelio con un asa extendidora de vidrio estéril para liberar las esporas. Se recogieron 0,5 mL de esa suspensión de esporas y se introdujo suavemente en el criovial relleno de sílica gel hasta empapar toda ella, mezclando bien con ayuda de un vórtex. El vial se cerró con la tapa de rosca y se selló por fuera con papel Parafilm M (Bemis NA, Neenah, WI, USA). De esta forma los crioviales pueden mantenerse a -80°C durante años sin que la cepa

fúngica pérdida viabilidad. Para posteriormente revivir los cultivos, simplemente es necesario esparcir unos pocos granos de sílica sobre una placa de PDA.

3. Cepas, oligonucleótidos y vectores

3.1. Cepas *E. coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas para clonar y generar las distintas construcciones de este estudio se presentan en la **Tabla 7**.

Cepa (genotipo)	Uso	Referencia
K-12 TOP10 [F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>]	Clonación/Amplificación de plásmidos	Invitrogen (Casadaban & Cohen, 1980)
K-12 DH5α [F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA</i> supE44 λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ 1 <i>gyrA96 relA1</i>]	Clonación/Amplificación de plásmidos	Invitrogen (Hanahan, 1983)
One Shot [®] <i>ccdB</i> Survival [™] 2 T1 ^R Competent Cells F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araΔ139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Clonación/Amplificación de plásmidos	Invitrogen (Bernard & Couturier, 1992; Bernard <i>et al.</i> , 1993)

Tabla 7: Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

3.2. Cepas de *C. graminicola*

Las cepas de *Colletotrichum* usadas en este estudio, a partir de las cuales se realizaron las distintas construcciones, fueron la cepa silvestre *C. graminicola* M1.001 BH y su cepa derivada marcada con GFP, M1.001 BH-GFP (Sukno *et al.*, 2008b).

Las cepas mutantes Δ Cgfl36 y Δ Cgfl88 son transformantes nulos del gen *Cgfl* obtenidas mediante la transformación de la cepa silvestre *C. graminicola* M1.001 con una construcción derivada del plásmido pKW1.

Las cepas mutantes Δ CPLS62, Δ CPLS66 y Δ CPLS72 son transformantes nulos del gen *CPLS* obtenidas mediante la transformación de la cepa *C. graminicola* M1.001 con una construcción diseñada con los flancos 5' y 3' del gen de la *CPLS* y un cassette de resistencia a higromicina.

Las cepas mutantes Δ CgEP318 y Δ CgEP340 son transformantes nulos del gen *CgEP3* obtenidas mediante la transformación de la cepa silvestre *C. graminicola* M1.001 con una construcción derivada del plásmido pKW1.

3.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se obtuvieron de IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) y están especificados en las tablas suplementarias de cada capítulo. Para su diseño se utilizaron las páginas web Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.4. Vectores de clonación para la generación de mutantes estables de *C. graminicola*

- **pENTR/D-TOPO** (Invitrogen).

Este vector está basado en la tecnología Gateway[®] que permite recombinación direccional de fragmentos de ADN que incluyan la secuencia de reconocimiento CACC al inicio del extremo N-terminal. En la **Figura 46** se presenta la estructura del plásmido pENTR/D-TOPO.

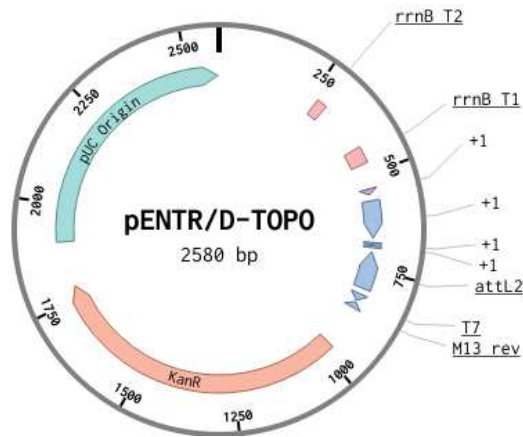


Figura 46: Mapa circular del plásmido pENTR/D-TOPO.

- **pKW1** (Vargas *et al.*, 2016).

Este vector derivado del plásmido pDONR-A-HYG (García-Pedrajas *et al.*, 2008a) se utilizó para obtener mutantes delecionados de los genes *Cgfl* y *CgEP3*. Se basa en la metodología de recombinación “Deletions via Gateway” (DelsGate), que combina la PCR con la tecnología Gateway®, ya que presenta sitios *attB1* y *attB2* donde se insertan los flancos 5’ y 3’ del gen a deleccionar. El plásmido pDONR-A-HYG utilizado en DelsGate es una versión modificada del vector pDONR201 (Invitrogen), que incluye la inserción de un marcador de selección formado por el promotor *TrpC* y un cassette de resistencia a higromicina para la posterior transformación en hongos ascomicetos. El vector pKW1 también contiene un cassette de expresión constitutiva del gen *GFP* obtenido a partir del plásmido *gGFP* (Maor *et al.*, 1998) (Fungal Genetics Stock Center). En la **Figura 47** se presenta la estructura del pDONR-A-HYG.

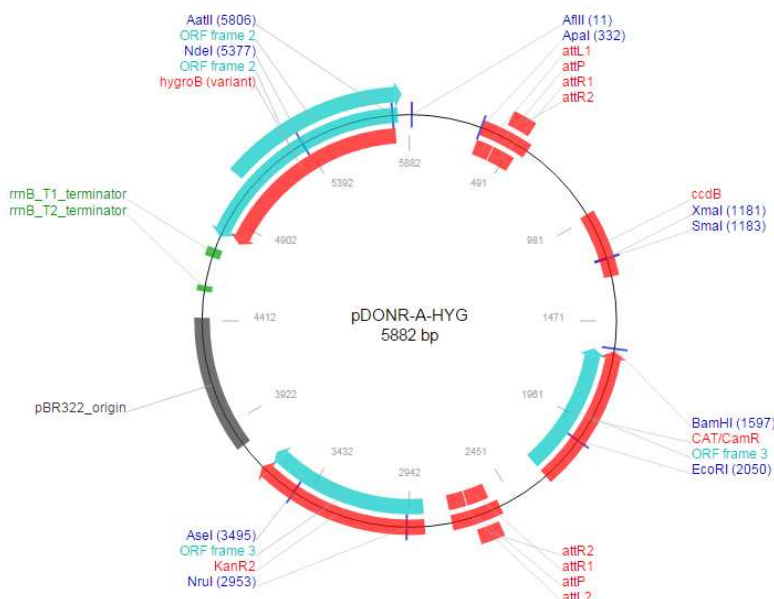


Figura 47: Mapa circular del plásmido pDONR-A-HYG.

- **pKW3** (Vargas *et al.*, 2016).

Este vector derivado del pEXS-GFP fue cedido por la Dra. Jane Parker (Max Planck Institute, Colonia, Alemania) y se utilizó para generar las fusiones transcripcionales con el promotor de los genes *Cgfl* y *CgEP3*. Basado en el sistema de clonación Gateway[®], contiene el cassette del gen reportero *GFP* aguas arriba del cual se clona el promotor génico a expresar. Contiene un cassette de resistencia a higromicina como marcador de selección. En la **Figura 48** se presenta la estructura del plásmido pKW3.

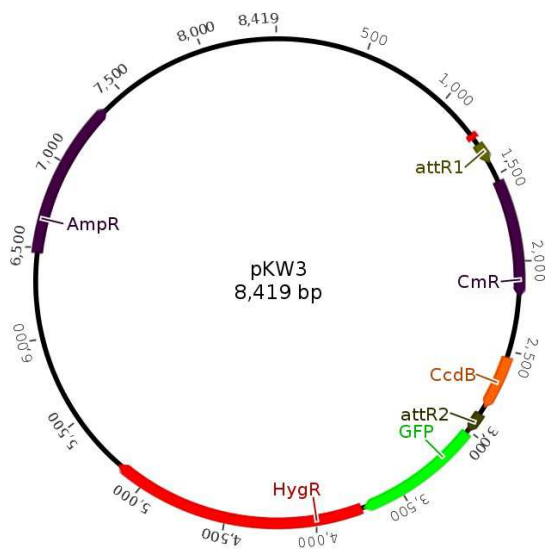


Figura 48: Mapa circular del plásmido pKW3.

- **pFPL-Gh** (Gong *et al.*, 2014).

Vector basado en la tecnología de recombinación Gateway[®] para generar fusiones moleculares con la proteína GFP en organismos fúngicos. Derivado del vector pCAMBIA1300 (Cambia, Canberra, Australia), se ha incorporado el cassette Gateway[®], un cassette de resistencia a higromicina como marcador de selección, el gen *GFP* y secuencias terminadoras fúngicas. El vector fue diseñado y cedido por el laboratorio del Dr. Mark Farman de la Universidad de Kentucky (Lexington, USA) y tiene un tamaño de 11.720 pares de nucleótidos. Este vector fue utilizado para construir la fusión transcripcional del promotor del gen *CPLS* con la *GFP*. En la **Figura 49** se presenta la estructura del plásmido pFPL-Gh.

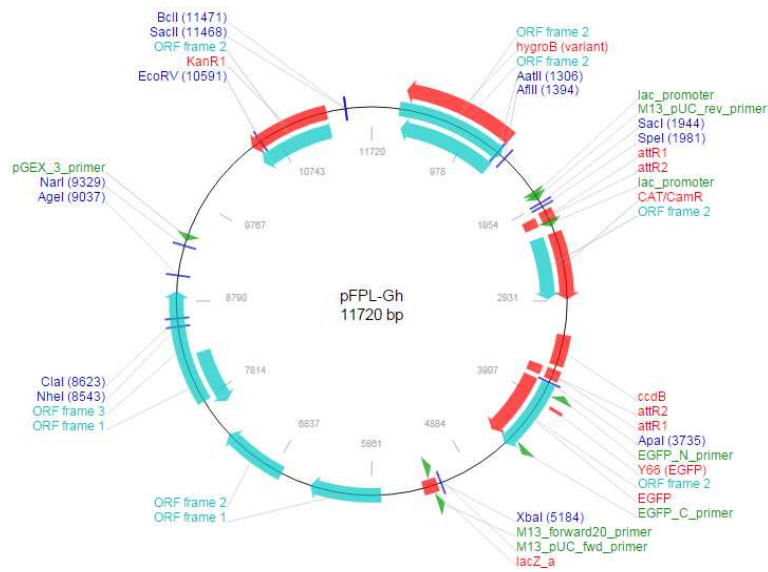


Figura 49: Mapa circular del plásmido pFPL-Gh.

- **pKW4** (Vargas *et al.*, 2016).

Es un vector destino utilizado para realizar la complementación de un gen previamente deletado. Basado en el sistema Gateway®, posee sitios de recombinación *attR1* y *attR2* compatibles con un vector de entrada que contenga sitios *attL1* y *attL2*. Incluye un cassette de resistencia al antibiótico nourseotricina como marcador de selección, que ha sido clonado a partir del pNRI (cedido por el Dr. Stefan Wirsel de la Universidad de Martin Luther, Halle-Wittenberg, Alemania). En la **Figura 50** se muestra la estructura del plásmido pKW4.

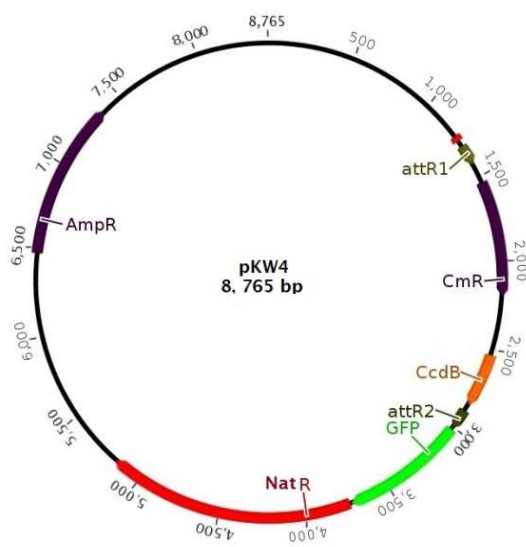


Figura 50: Mapa circular del plásmido pKW4.

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

Este plásmido fue utilizado para llevar a cabo la sobreexpresión de los genes *Cgfl* y *CPLS*. Contiene el promotor del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans*, el cual posee una expresión fuerte y constitutiva (Smith T.L. & S.A., 1990). Utilizando la tecnología de clonación USERTM Friendly desarrollada por New England Biolabs, permite clonar direccionalmente un fragmento génico aguas abajo del *PgpdA*. Contiene además un cassette de resistencia a higromicina como marcador de selección. En la **Figura 51** se presenta la estructura del plásmido pRF-HUE.

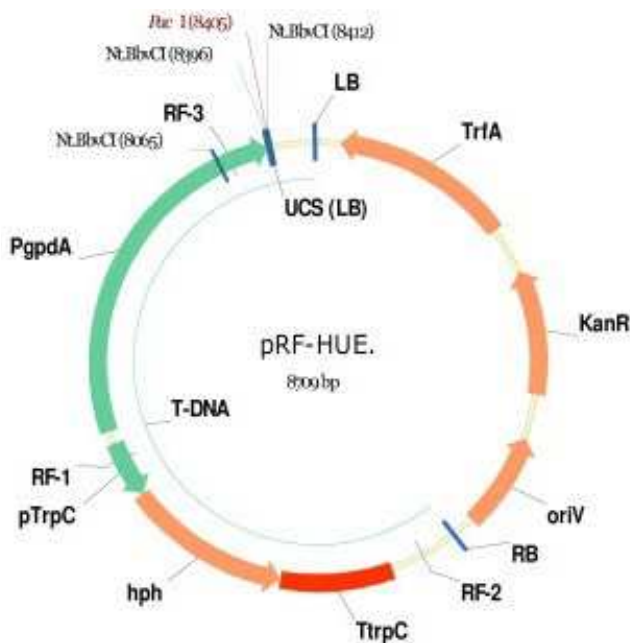


Figura 51: Mapa circular del plásmido pRF-HUE.

4. Métodos microbiológicos estándar

4.1. Transformación de *E. coli*

Para la transformación de *E. coli* con plásmidos se siguió el método del choque térmico. Una alícuota de 50 μ L de células almacenadas a -80°C se dejó descongelar en hielo y posteriormente se añadieron de 1 a 5 μ L de plásmido o ligación según la concentración (habitualmente entre 5 y 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se sometió a las células a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y medio. La mezcla de transformación se incubó después durante 2 minutos

en hielo y posteriormente se añadieron 350 μ L de medio líquido LB. Se incubó durante 1 hora y media a 37°C y 250 r.p.m., y finalmente la mezcla de transformación se plaqueó en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente. Estas placas se incubaron a 37°C durante 16 horas aproximadamente. Al cabo de este periodo de tiempo se puede apreciar el crecimiento de las colonias bacterianas que han sido transformadas.

4.2. Transformación de *C. graminicola*

La preparación de protoplastos se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por (Thon *et al.*, 2000). Para ello, se recolectaron esporas de *C. graminicola* crecido previamente en placa de PDA durante 15 días, se lavaron con agua y se contaron con ayuda de una cámara Thoma. Se ajustó la concentración a 1×10^8 esporas/mL y se incubaron en 100 mL de medio Fries durante 48 horas a 30°C y 60 r.p.m. Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m., se resuspendió en solución enzimática (100 mg/mL de enzima lítica de *Trichoderma harzianum* en NaCl 0,7 M) y se volvió a incubar a 30°C y 60 r.p.m. durante 5 horas. Posteriormente se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en medio STC (Tris-HCl 10 mM, sorbitol 1,2 M y CaCl₂ 50 mM), repitiéndose este paso de nuevo una segunda vez. Finalmente las esporas se resuspendieron en medio STC a una concentración final de 10^8 esporas/mL, se dividieron en alícuotas de 100 μ L y éstas se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Para realizar la transformación de *C. graminicola*, se utilizó una alícuota de 50 μ L de protoplastos almacenados a -80°C, que se dejó descongelar en hielo lentamente. En un tubo Falcon de 50 mL previamente enfriado, se añadieron los 50 μ L de protoplastos y 5 μ L de plásmido (a una concentración de 1 μ g aproximadamente), mezclando muy suavemente con la punta de la pipeta, y se incubó en hielo durante 25 minutos. Pasado este tiempo, se añadió gota a gota 500 μ L de solución PEG mezclando suavemente, y la mezcla se incubó otros 25 minutos, esta vez a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 20 mL de medio de regeneración, previamente calentado a 48°C, y también se añadió el antibiótico al que el plásmido portaba resistencia. En caso de la higromicina (Roche Diagnostics) se añadieron 100 μ L de un stock a concentración 50

mg/mL y en caso de la nourseotricina (Sigma-Aldrich) se añadieron 20 μ L de un stock a concentración 50 mg/mL. Una vez añadido el antibiótico, se mezcló por inversión 3 veces y se plaqueó en una placa Petri de 90 mm de diámetro. Las placas fueron incubadas a 23°C durante 5-7 días, bajo iluminación continua, hasta que los protoplastos crecieron lo suficiente para ser aislados. Pasado éste tiempo, los transformantes que empezaron a crecer fueron transferidos a placas individuales de medio PDA con higromicina (50 μ g/ μ L). Posteriormente, de cada uno de los transformantes se obtuvo una nueva colonia procedente de un único conidio mononucleado.

Solución PEG

Mezclar 2 partes de PEG con una parte de KTC 3X hasta disolver completamente.

Solución KTC 3X

-KCl 1,8 M

-Tris HCl 150 mM

- CaCl₂.2H₂O 150 mM

Ajustar a pH=8 y esterilizar mediante filtración.

PEG 3350 al 60% (V/V) en agua destilada. Autoclavar.

4.3. Ensayos de tasa de esporulación *in vitro*

La extracción de esporas se realizó en una cabina de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. Se recogieron esporas de cultivos de *C. graminicola* crecidos en placa de PDA durante 15 días, en las condiciones previamente descritas. Para ello, se añadieron 10 mL de agua destilada estéril sobre la superficie del micelio y se frotó suavemente con la ayuda de un asa extendidora de vidrio estéril para levantar las esporas y dejarlas en suspensión. Seguidamente, esta solución de esporas y restos de micelio se colectó en un tubo Falcon de 50 mL, filtrándose a través de un embudo con doble gasa previamente esterilizado. Esto permite retener los fragmentos de hifas que puedan haberse desprendido al frotar la superficie miceliar. Se volvió a repetir este paso con

otros 10 mL de agua para recoger las esporas que pudieran haber quedado en la placa, y el volumen se completó con agua estéril hasta 40 mL. Posteriormente, la suspensión de esporas se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos. Una vez centrifugado, el sobrenadante se descartó y el pellet de esporas se agitó en vórtex para resuspender los conidios. Se añadieron otros 40 mL de agua y se volvió a centrifugar de nuevo. Este paso se repitió una vez más, y finalmente las esporas fueron resuspendidas en 30 mL de agua destilada estéril, listas para ser cuantificadas mediante una cámara Thoma.

4.4. Ensayos de tasa de germinación de esporas *in vitro*

Las esporas se recolectaron desde placa de PDA siguiendo las mismas indicaciones descritas anteriormente. Se contaron en la cámara Thoma y se realizaron diluciones finales a una concentración de 1×10^4 esporas/mL. Una vez preparadas estas diluciones, se dispusieron 3 gotas de 100 μ L en la superficie de una placa Petri de 90 mm de diámetro. Las placas se incubaron a 23°C en un recipiente cerrado con ambiente húmedo, durante 24 horas, para permitir la germinación de las esporas y al día siguiente se llevó a cabo el conteo con ayuda de un microscopio óptico.

4.5. Ensayos de tasa de germinación de esporas *in vivo*

Las esporas se recolectaron desde placa de PDA siguiendo las mismas indicaciones descritas anteriormente. Se contaron en la cámara Thoma y se realizaron diluciones finales a una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Una vez preparadas estas diluciones, se dispusieron varias gotas de 7,5 μ L en la superficie de “leaf sheaths” o vainas de la hoja de maíz. Estos “leaf sheaths” se incubaron a 23°C en un recipiente cerrado con ambiente húmedo, durante 24 horas, para permitir la germinación de las esporas y al día siguiente se llevó a cabo el conteo con ayuda de un microscopio óptico.

5. Métodos de biología molecular

5.1. Técnicas de clonación utilizadas

Técnica DelsGate (García-Pedrajas *et al.*, 2008a).

En esta técnica se combina el sistema de clonación Gateway[®] desarrollado por Invitrogen con la PCR para generar construcciones de delección génica de una forma rápida y simple. Para generar la construcción de delección es necesario seguir 3 pasos: **1)** amplificación de manera independiente de las regiones flanqueantes 5' y 3' del ORF del gen de interés (1 Kb aproximadamente), **2)** clonación BP Gateway[®] y **3)** transformación en *E. coli* (**Figura 52**). Para la amplificación del flanco 5' se incluyó una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa I-SceI en el extremo 5' del cebador "forward" (cebador 1), y una secuencia *attB1* en el extremo 5' del cebador "reverse" (cebador 2). Para la amplificación del extremo 3' se añadió una secuencia *attB2* en el extremo 5' del cebador "forward" (cebador 3) y la secuencia de reconocimiento de la I-SceI en orientación reversa en el extremo 5' del cebador "reverse" (cebador 4). Los productos de PCR se insertan en el plásmido donador mediante el sistema de clonasa BP Gateway[®]. Este plásmido contiene un marcador de selección para hongos filamentosos, habitualmente se utiliza el cassette *hygR* (Staben *et al.*, 1989). Durante la reacción con la clonasa BP, los flancos 5' y 3' purificados recombinan con las secuencias presentes en el vector donador *attP1* y *attP2*, respectivamente. Esta reacción genera una molécula lineal, con secuencias de 18 pares de bases (el sitio de reconocimiento I-SceI) situadas en los extremos y con orientación opuesta. Posteriormente, se transforma en *E. coli* y se genera una construcción lineal debido a que estas secuencias homólogas recombinan *in vivo*. El plásmido resultante contiene un marcador de resistencia y los flancos del ORF de interés separados por el sitio de reconocimiento I-SceI. Este plásmido se comprueba mediante digestión con enzimas de restricción, mediante PCR utilizando cebadores que amplifiquen los flancos 5' y 3' y finalmente secuenciación. Posteriormente, se digiere el plásmido con la endonucleasa I-SceI (Roche Diagnostics), incubando a 37°C durante una noche, se precipita mediante la adición de 1 volumen de etanol absoluto y un décimo de volumen de acetato de

sodio 3 M y el plásmido linealizado se transforma en protoplastos de *C. graminicola* M1.001.

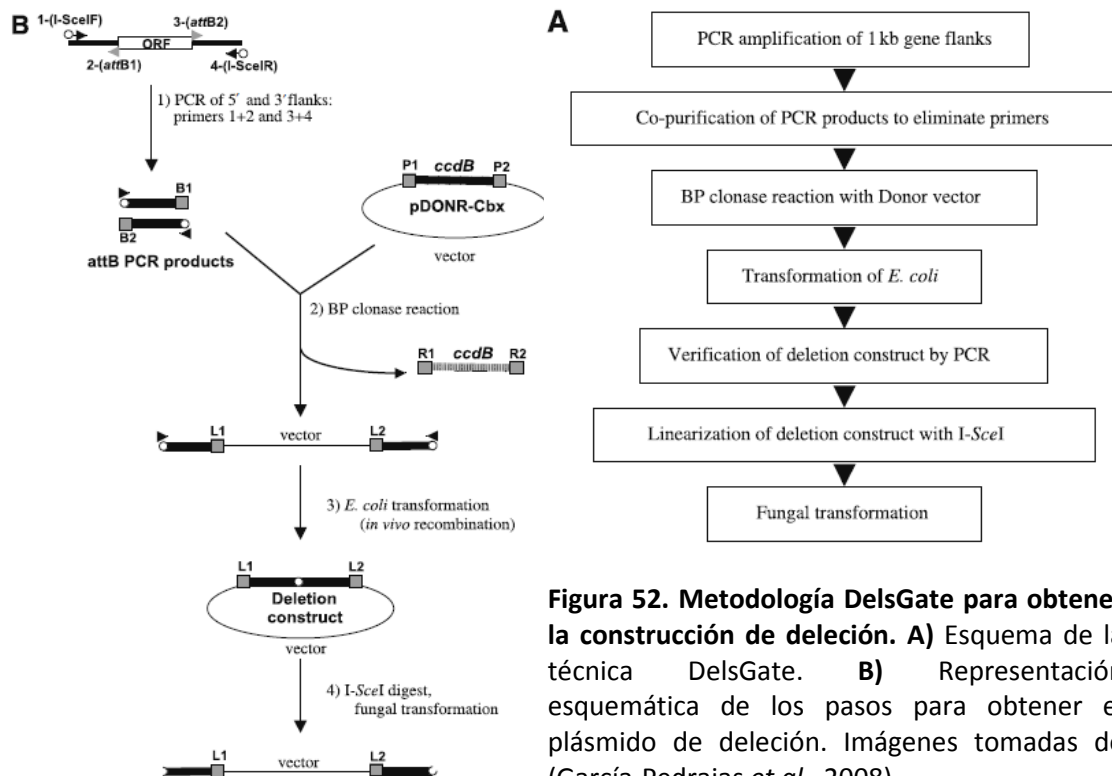


Figura 52. Metodología DelsGate para obtener la construcción de deleción. A) Esquema de la técnica DelsGate. **B)** Representación esquemática de los pasos para obtener el plásmido de deleción. Imágenes tomadas de (García-Pedrajas *et al.*, 2008).

Técnica Double-joint PCR (Yu *et al.*, 2004).

La técnica Double-joint PCR (DJ-PCR) permite obtener fácilmente construcciones de reemplazamiento génico y ha sido empleada con éxito en diversas especies de hongos filamentosos. Esta técnica combina dos o tres fragmentos de ADN (las regiones flanqueantes del ORF a deleccionar y un marcador de selección) para construir moléculas recombinantes de ADN, utilizando varias rondas de PCR. A continuación se describen con detalle cada uno de los pasos a seguir:

1) Primera ronda de PCR. Amplificación de los flancos 5' y 3' del gen de interés.

Primeramente se amplifican mediante PCR las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen a deleccionar, de manera independiente. Para ello se utilizan dos parejas de cebadores (cebadores 1 y 2 que amplifican el flanco 5'; y cebadores 3 y 4 que amplifican el flanco 3'). El cebador 1 será el cebador 5' "forward" y el cebador 2 será el cebador 5' "reverse", que además incluye en su extremo 3' una secuencia del extremo del

marcador de selección. El cebador 3 será el cebador 3' "forward", que incluye en su extremo una secuencia del marcador de selección, y el cebador 4 será el cebador 3' "reverse". Además, también se amplifica mediante PCR el marcador de selección. Los productos de PCR se comprueban mediante electroforesis en gel de agarosa y se purifican utilizando un kit de limpieza de productos de PCR.

2) Segunda ronda de PCR. Fusión de los tres fragmentos.

Se realiza una PCR utilizando como molde cada uno de los tres fragmentos amplificados en la ronda anterior, junto con dNTPs 2,5 mM, enzima DNA polimerasa de alta fidelidad, tampón 10X para la DNA polimerasa, los cebadores 1 y 4 y agua milli-Q estéril. El ratio molar de los fragmentos de ADN añadidos (flanco 5' - marcador de selección - flanco 3') sigue normalmente una relación 1:3:1 y la cantidad total de ADN añadida debe mantenerse entre 10-100 ng. Las condiciones de incubación de la PCR son las siguientes: 94°C durante 2 minutos, 10-15 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C 30 segundos, 58°C 10 minutos y 72°C 5 minutos, y por último 10 minutos de extensión final a 72°C.

3) Amplificación y comprobación de la construcción de delección.

En este paso se confirma la correcta inserción de los tres fragmentos de ADN mediante digestión con enzimas de restricción, amplificación mediante PCR y finalmente secuenciación. En la **Figura 53** se muestra una representación del proceso de ensamblaje de una construcción de interrupción génica siguiendo el método DJ-PCR.

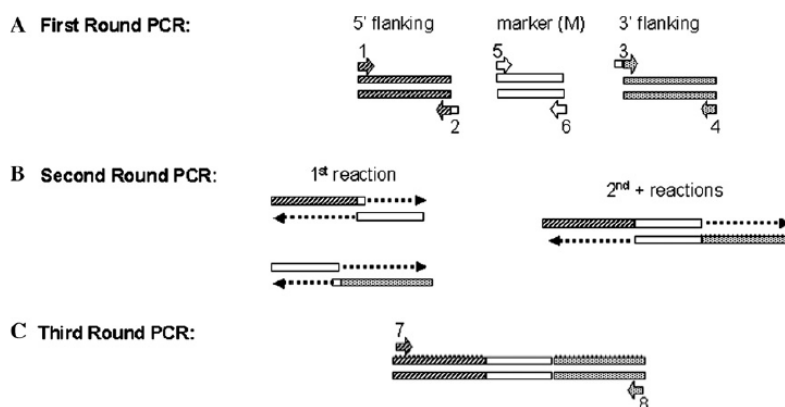


Figura 53. Representación esquemática de la construcción de un cassette de reemplazamiento génico utilizando la metodología DJ-PCR. Imagen tomada de (Yu *et al.*, 2004).

Clonación basada en sistema Gateway®

El sistema de clonación Gateway® desarrollado por Invitrogen es un método universal de clonación que utiliza las propiedades de recombinación específica de sitio del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Para ello, utiliza las secuencias de recombinación *attB1* y *attB2* o *attL1* y *attL2* junto con las enzimas clonasa BP o LR, que catalizan la reacción de recombinación. Existen dos reacciones de recombinación en la tecnología Gateway®:

Reacción BP: Facilita la reacción de un sustrato con sitios *attB* (puede ser un producto de PCR o un vector linearizado) con un sustrato con sitios *attP* (vector donador) para crear un vector de entrada que contiene sitios *attL*. Esta reacción está catalizada por la enzima clonasa BP.

Reacción LR: Facilita la recombinación de un sustrato con sitios *attL* (vector de entrada) con un sustrato con sitios *attR* (vector destino) para crear un vector de expresión que contenga sitios *attB*. Esta reacción está catalizada por la enzima clonasa LR.

En la **Figura 54** se presenta un esquema del sistema de clonación Gateway® con los dos tipos de reacciones.

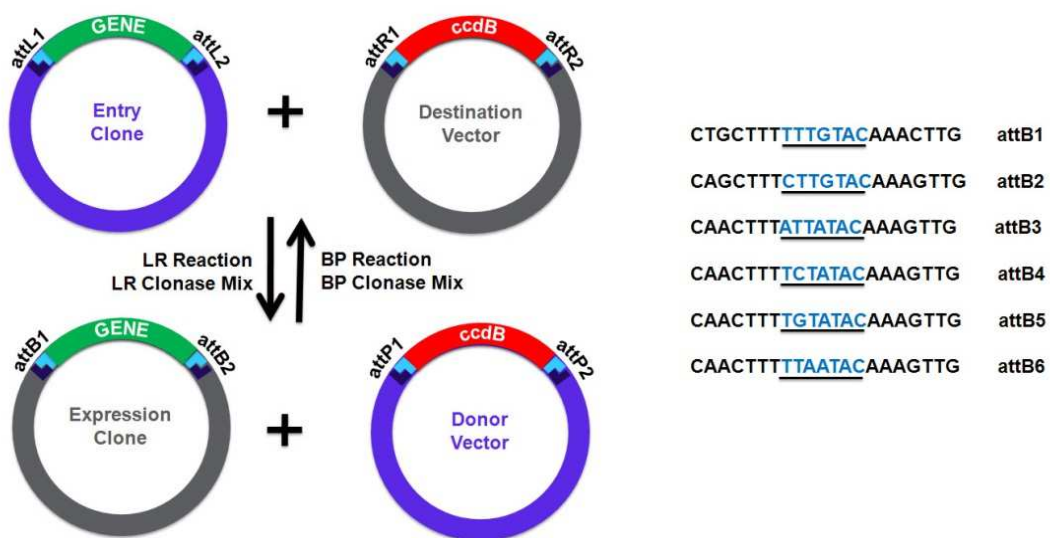


Figura 54: Esquema de los distintos pasos implicados en la clonación Gateway®.

Clonación basada en tecnología USER™ Friendly

La técnica de clonación USER (uracil-specific excision reagent) Friendly desarrollada por New England Biolabs permite llevar a cabo la clonación direccional de productos de PCR, independientemente del uso de enzimas de restricción y ADN ligasas, para fusionar un fragmento de PCR a los extremos de un vector. Esta técnica necesita el diseño de unos cebadores que amplifiquen la región genómica deseada y que contengan en sus extremos 5' una secuencia específica de 9 pb que incluya un único nucleósido 2-deoxiuridina y que sea solapante con el vector a utilizar. El producto de PCR se trata con la enzima USER (New England Biolabs), que contiene una mezcla de uracil DNA glicosilasa y DNA glicosilasa-liasa, para crear extensiones de cadena sencilla únicas en el extremo 3'. Posteriormente, se generan los extremos solapantes de 9 pb en el vector destino mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción *PacI* y *Nt.BbvCI* (New England Biolabs). El anillamiento de los productos de PCR tratados con la enzima USER y el vector digerido permite la formación de una molécula estable, que puede ser utilizada para la transformación directa en *E. coli*. Esta transformación une los fragmentos de ADN mediante ligación *in vivo*, catalizada por los sistemas de reparación de ADN de la propia *E. coli*, obteniéndose finalmente la construcción. En la **Figura 55** se muestra un esquema de la técnica de clonación USER™ Friendly desarrollada por New England Biolabs.

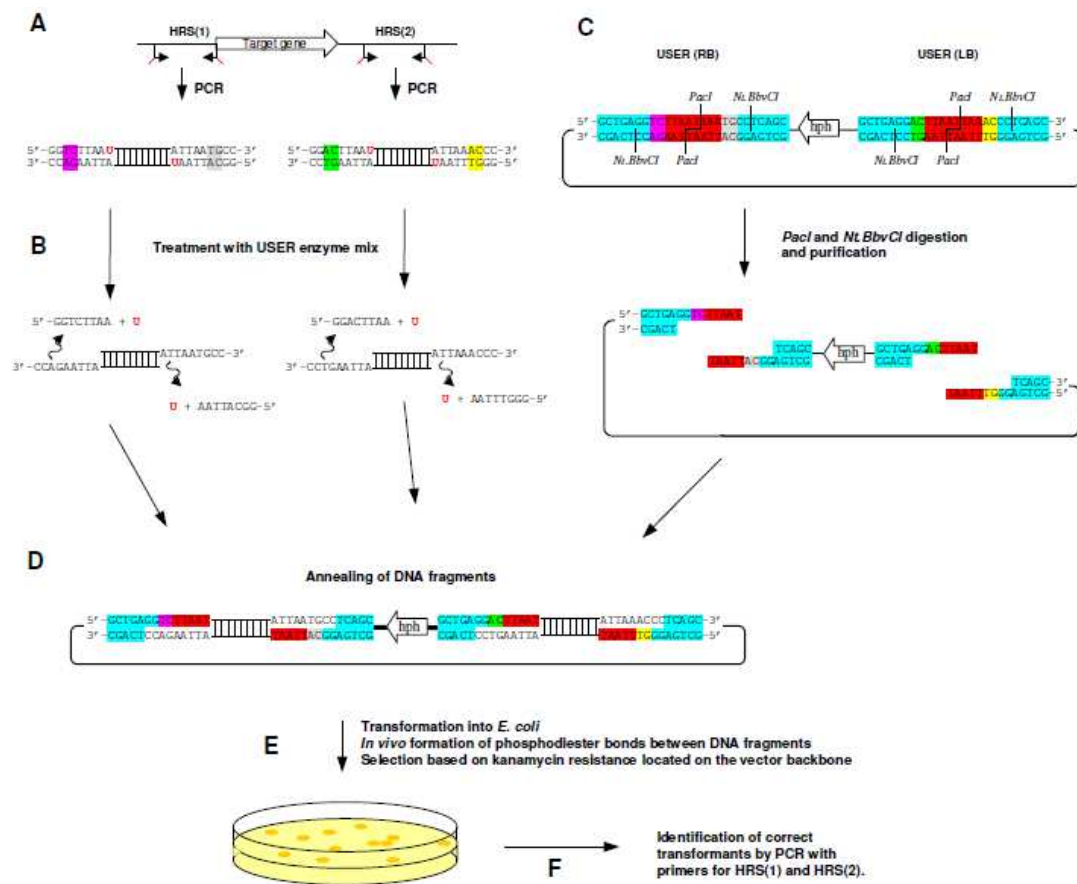


Figura 55. Técnica de clonación USER™ Friendly. **A)** Amplificación de las dos secuencias de recombinación homólogas con oligos que contienen extensiones de 5′deoxiuridina. **B)** Tratamiento de los productos de PCR con la enzima USER, generando extremos 3′ solapantes. **C)** Diseño del vector USER con dos sitios de clonación USER (LB y LR). La digestión del vector produce dos fragmentos de ADN con cuatro extremos 3′ solapantes de 9 pb adicionales. Cada uno de los extremos del vector USER contiene un sitio *PacI* (en rojo) y dos sitios *Nt.BbvCI* (en azul). **D)** Mezcla y anillamiento de los dos fragmentos de ADN del vector y de los dos insertos de PCR. **E)** Transformación en *E. coli*. **F)** Análisis de las colonias transformantes y comprobación mediante PCR. Imagen tomada de (Frandsen *et al.*, 2008).

5.2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

5.2.1. Aislamiento de ADN genómico de *C. graminicola*

Método CTAB (Murray & Thompson, 1980).

El ADN genómico fue aislado a partir de muestras de micelio pulverizadas en mortero con N₂ líquido o liofilizadas durante 8 horas en liofilizador (Virtis advantage) conectado a una bomba de vacío (Savant ValuPump VLP120). Se homogeneizaron 200-400 mg de tejido en la solución DEB a 65°C durante 1 hora, agitándose manualmente por inversión cada 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 0,5 volúmenes de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y 0,5 volúmenes de fenol a la muestra, y se centrifugó en frío a 12.500 x g durante 15 minutos, tras haber sido mezcladas manualmente mediante inversiones continuas. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, al que se añadió un volumen de cloroformo-álcool isoamílico y se centrifugó en las mismas condiciones. El ARN fue eliminado añadiendo 1 µL de ARNasa (Ambion) e incubando la muestra a 37°C durante 30 minutos. En un tubo nuevo se mezcló la fase acuosa obtenida con una solución de isopropanol-acetato amónico 7,5 M (4:1). La muestra se conservó a -20°C durante 30 minutos. Después, se centrifugó en una micrófuga *ependorf* de poyata a máxima velocidad (14.000 x g) durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante. Tras comprobar la existencia de precipitado, se lavó al menos dos veces con 1 mL de etanol 70% (V/V), centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 50-100 µL de agua milli-Q estéril.

- Solución DEB (1:1:0,4):

Tampón de lisis nuclear (200 mL Tris-HCl 1 M pH=7,5; 100 mL EDTA 0,5 M pH=8; CTAB 5% 20 g ajustando hasta 1 L con agua destilada).

Tampón de aislamiento de ADN (Sorbitol 63,78 g; Tris Base/THAM 12,1 g; EDTA 1,68 g en 1 L de agua destilada; pH=7,5).

N-laurilsarcosina 5% (m/V).

Kit E.Z.N.A.[®] Plant DNA

Utilizando muestras de micelio homogeneizado en mortero con N₂ líquido, se obtuvo el ADN siguiendo las indicaciones recomendadas por el kit comercial E.Z.N.A.[®] Plant DNA (Omega Bio-tek Inc, Norcross, GA, USA).

5.2.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *E.coli*

El ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit comercial NucleoSpin[®] Plasmid de Macherey-Nagel. Los cultivos de *E.coli* se crecieron en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente a la resistencia que portara cada plásmido, durante toda la noche a 37°C. Después de centrifugarlos durante 5 minutos a 3.000 r.p.m., el sobrenadante se descartó y el pellet de células se resuspendió en 250 µL de buffer de resuspensión A1, mediante agitación en vórtex. Una vez resuspendido, se añadieron 250 µL de buffer A2, se mezcló la suspensión mediante inversión manual 5 o 6 veces y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 300 µL de buffer A3 y se agitó por inversión manual 5 o 6 veces. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 r.p.m., y el sobrenadante (volumen máximo 750 µL) fue transferido a un columna de elución. Esta columna se centrifugó a 11.000 r.p.m. durante 1 minuto y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 500 µL de tampón AW precalentado a 50°C a la columna y se centrifugó de nuevo a 11.000 r.p.m. durante 1 minuto. Más tarde, se añadieron 750 µL de tampón A4 y se volvió a centrifugar 1 minuto, descartando el sobrenadante. Después, se centrifugó 2 minutos la columna a 11.000 r.p.m. para secar cualquier resto de tampón que quedara en la membrana y se eluyó con H₂O milli-Q estéril precalentada a 70°C. La columna se incubó 5 minutos a 70°C y se centrifugó 1 minuto a 11.000 r.p.m., obteniéndose así el plásmido.

El kit comercial NucleoBond[®] Xtra Midi (Macherey-Nagel) fue utilizado cuando era necesario obtener un alto grado de pureza en la obtención de una gran cantidad de ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante y partiendo de cultivos bacterianos de 100 mL.

5.2.3. Aislamiento de ARN total de micelio o tejido vegetal

Para la obtención de ARN a partir de micelio o tejido de maíz infectado con *C. graminicola*, las muestras se recogieron al tiempo deseado y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. Posteriormente, fueron homogeneizadas en mortero con N₂ constante, hasta conseguir un fino polvo. El RNA se obtuvo siguiendo el método de extracción TRIzol[®] (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras la obtención del tejido homogeneizado se añadió 1 mL de TRIzol reagent, se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x g. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 200 µL de cloroformo. Se mezcló mediante agitación manual durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 x g, se transfirió el sobrenadante a un tubo *ependorf* nuevo y 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 a 12.000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con etanol 75 % (V/V), diluido con agua milli-Q tratada con DEPC 1% (V/V), centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos. Por último, se añadieron 50 µL de agua milli-Q DEPC 1% (V/V) y se incubó a 60°C durante 10 minutos para resuspender el precipitado. Todo el proceso de extracción, incluidas las centrifugaciones, se realizó a 4°C con el fin de evitar la degradación del ARN.

También se empleó un método alternativo de extracción de ARN utilizando el kit de extracción de ARN SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La calidad de los ARN extraídos fue comprobada a través de electroforesis en gel de agarosa/ formaldehído 1% (p/V).

5.2.4. Purificación de ARN

La limpieza del ARN extraído con los diferentes protocolos se llevó a cabo usando el kit TURBO DNA-free[™] de Ambion (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación y calidad del ARN se obtuvo a través de medida fotométrica empleando el espectrofotómetro NanoDrop ND_1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se midió la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm. La

razón A_{260}/A_{280} indica la pureza del ácido nucleico respecto de las proteínas, la cual es 1,8 para el genoma de *E.coli* y 2 para el ARN total.

5.2.5. Purificación de ADN plasmídico

Los ácidos nucleicos procedentes de una reacción de PCR o de una digestión con enzimas de restricción, se purificaron utilizando el kit NucleoSpin[®] PCR and Gel Clean-up (Macherey-Nagel) a partir de gel de agarosa, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En el caso de la recuperación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa, se tomaron diversas consideraciones previas, como un bajo porcentaje de agarosa en torno a 0,5-0,7 % (p/V), un bajo voltaje y una alta resolución para obtener el fragmento deseado. Tras la electroforesis, se cortó el bloque de agarosa que contenía el fragmento de interés con la ayuda de un bisturí estéril y se procedió a su purificación con el kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3. Manipulación de ácidos nucleicos

5.3.1. Digestión del ADN

Para la digestión de fragmentos de ADN, se utilizaron endonucleasas de la casa comercial Takara, Roche Diagnostics y New England Biolabs. Las digestiones se incubaron durante un tiempo comprendido entre 2 y 16 horas, según el propósito del experimento, a la temperatura de actividad específica de la enzima. Se usaron entre 0,5 µg y 5 µg de ADN por reacción. Una reacción típica de digestión constaba de los siguientes componentes:

- Buffer 10X de la enzima: 2 µL
- ADN plasmídico: 0,5-2 µg
- Endonucleasa de restricción: 1 µL (0,5U)
- H₂O: hasta completar 20 µL

5.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de ADN de pequeño tamaño se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). Todas las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp 9700 PCRSystem de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se usaron distintas ADN polimerasas, dependiendo de la aplicación. Para llevar a cabo reacciones de amplificación comunes y que no requerían ningún tratamiento especial, se usó la enzima ADN polimerasa de Biotools. Para amplificaciones de ADN que requerían un alto grado de fidelidad al molde y ausencia de errores e inespecificidades, o para aquellos casos en los que fue necesario amplificar un fragmento de ADN mayor de 4 Kb con alto rendimiento, se usó el kit PCR Extender Polymerase Mix (5Prime, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las PCRs se realizaron en un volumen de 25 μ L.

El esquema del programa de PCR utilizado para ambas polimerasas fue el siguiente:

Desnaturalización inicial, (desnaturalización, anillamiento de los cebadores al ADN molde, elongación de la cadena) x número de ciclos, elongación final.

El tiempo de elongación se escogió de acuerdo a la longitud del fragmento de ADN a amplificar y a la eficiencia de síntesis de la ADN polimerasa, tomando como referencia que 1.000 pares de bases necesitan 1 minuto de extensión. La temperatura de anillamiento se calculó con el programa informático de diseño de cebadores Primer3, que se encuentra dentro del software Geneious R6 (Biomatters, Nueva Zelanda), y también mediante la página web Oligoanalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Componentes usados en la reacción de PCR

- Buffer 10X: 2,5 μ L

- dNTPs 2,5 mM: 2 μ L

- Cebador 1 10 μ M: 0,25 μ L

- Cebador 2 10 μ M: 0,25 μ L

- ADN polimerasa: 0,3 μ L

-ADN molde (100 ng)

-H₂O hasta completar 25 µL de volumen final.

Programa: 94°C 2 minutos, [94°C 30 segundos, 55-63°C 30-35 segundos, 72°C 30 segundos-2 minutos] x 30-40 ciclos, 72°C 5 minutos y finalmente conservación a 4°C.

5.3.3. RT-PCR

Una vez realizado el tratamiento con DNAsa para eliminar cualquier resto de ADN genómico, el ARN obtenido se utilizó para sintetizar el ADN copia (ADNc). Para ello se usó la enzima retrotranscriptasa inversa M-MLV RT de Promega (Madison, WI, USA).

En un tubo de microcentrífuga libre de ARNasas, se mezcló 1 µg de ARN y 1 µL de oligo dT, añadiendo agua DEPC hasta un volumen final de 15 µL. Se calentó el tubo a 70°C durante 5 minutos para que el oligo dT anillara y después se enfrió en hielo. Posteriormente, se añadieron los siguientes componentes: 5 µL de buffer 5X M-MLV RT, 2,5 µL de dNTPs 2,5 mM, 1 µL de enzima M-MLV RT, 2 µL de inhibidor de ribonucleasas ARNsin[®] (Promega, Madison, WI, USA) y agua DEPC hasta completar un volumen final de 25 µL. La reacción se incubó durante una hora a 42°C, seguido de 20 minutos a 75°C. Finalmente, el ADNc se utilizó para realizar una PCR estándar, a fin de comprobar que el proceso de síntesis se ha llevado a cabo de forma correcta y puede emplearse para PCR en tiempo real. Se utilizó 1 µL de ADNc y el resto se almacenó a -80°C para su posterior uso.

Adicionalmente, también se utilizó el kit PrimeScript[™] RT reagent (Takara Biosystems), siguiendo las condiciones del fabricante.

Para comprobar la integridad del ADNc y su posible contaminación con ADN, se realizaron amplificaciones mediante PCR convencional utilizando el gen codificante de la β-tubulina, que incluye un intrón, el cual permite distinguir la consiguiente diferencia de tamaños entre los amplicones genómicos y el ADNc.

5.3.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se utilizó un termociclador Step One Plus[™] de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). El ADNc generado fue utilizado junto con el kit KAPA SYBR[®] FAST ABI Prism[®] 2X qPCR Master Mix (KAPA Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA) para la amplificación en tiempo real, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en 10 µL de volumen final, utilizando 1 µL de ADNc y 9 µL de una mezcla de buffer KAPA SYBR[®] FAST, cebadores y agua milli-Q estéril.

El programa de amplificación fue 95°C durante 2 minutos y 40 ciclos de 95°C 30 segundos y 60°C 30 segundos. La especificidad de la reacción fue comprobada después de la amplificación basándose en la curva de disociación obtenida. Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método comparativo de Ct (Livak & Schmittgen, 2001), y el software Step One™ v.2.2.2 (Applied Biosystems) se usó para llevar a cabo los cálculos posteriores. Finalmente, se aplicó test estadísticos ANOVA seguidos de una prueba Tukey's HSD para conocer el nivel de significancia de los diferentes valores de expresión génica, utilizando el programa estadístico Statistix 8.0.

5.3.5. Secuenciación de ácidos nucleicos

Las construcciones generadas en este trabajo fueron secuenciadas para comprobar que no existiera ninguna mutación puntual en la secuencia del gen. Se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca, que dispone de un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los fragmentos de ADN y plásmidos a secuenciar fueron aislados usando el kit NucleoSpin[®] PCR and Gel Clean-up o el kit NucleoSpin[®] Plasmid de Macherey-Nagel, respectivamente. La concentración del ADN de las muestras se determinó mediante espectrofotometría usando el NanoDrop ND_1000 y antes del envío se ajustó de acuerdo a los requerimientos del Servicio de Secuenciación.

5.4. Separación y detección de ácidos nucleicos

5.4.1. Electroforesis en gel de agarosa

Para la separación específica por tamaño de fragmentos de ADN, se utilizaron geles de agarosa de entre 0,7 y 2,5 % de concentración (p/V), en función del tamaño esperado. Se disolvió la agarosa en tampón TAE 1X y se dejó solidificar a temperatura

ambiente en los moldes correspondientes. Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga de electroforesis 6X y se cargaron en el gel. Los geles se colocaron en cubetas de electroforesis de 15 y 30 cm de largo, llenas de tampón TAE 1X y las muestras fueron separadas aplicando un voltaje constante de entre 80-120 voltios (V).

Para visualizar los fragmentos de ADN, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (2,5 μ L de bromuro de etidio en 100 mL), se destiñó durante 10 minutos en agua destilada y posteriormente se expuso a irradiación con luz UV ($\lambda=365$ nm), utilizando el equipo de transiluminación Alphascreen MINI (Protein Simple, San Jose, CA, USA). Las imágenes de los geles se capturaron con la cámara de este mismo equipo.

- Tampón TAE 50X: Tris Base 2 M, Ácido acético 2 M, EDTA 50 mM pH=8.
- Tampón de carga 6X: Glicerol 30% (p/V), Azul de bromofenol 0,1% (p/V), Xilén cianol FF 0,1% (p/V).

5.4.2. Análisis Southern blot

Primeramente, se aisló ADN genómico por el método descrito en el apartado 4.1.5.2. Para ello, se usaron 10 μ g de ADN genómico que fueron digeridos con enzimas de restricción. El ADN digerido se precipitó añadiendo 1/10 del volumen final de acetato de sodio 3 M pH=5 y 2,2 volúmenes de etanol 96 % (V/V), y se incubó a -20°C durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet resultante se lavó con 750 μ L de etanol 70% (V/V), y se volvió a centrifugar a 7.500 x g durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se volvió a descartar, se secó el pellet brevemente, se resuspendió en 25 μ L de agua milli-Q estéril y se añadieron 4 μ L de frente de carga 6X. Más tarde, los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa durante 5 horas aproximadamente (solución TAE 1X, agarosa 0,8% (p/V), 90 V). Los geles se visualizaron con bromuro de etidio y se marcaron convenientemente para identificarlos y orientarlos. Antes de transferir el gel de agarosa a la membrana, éste se sometió a tratamiento en distintas soluciones, con agitación suave. Primeramente, se realizó un proceso de depurinación, consistente en someter al gel durante 5 minutos a luz UV ya que de esta forma la transferencia de fragmentos grandes de ADN se ve facilitada. Más tarde, el gel se incubó en solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M y

NaOH 0,5 M) durante 15 minutos dos veces, lavando el gel con agua destilada durante 5 minutos después de ambas incubaciones. A continuación, se incubó el gel en solución de neutralización (NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M pH=7,5) durante 15 minutos, repitiendo este paso después con solución nueva. Finalmente, el equilibrado se realizó con solución SSC 10X (NaCl 1,5M y citrato sódico 0,15 M pH=7) durante 10 minutos. Posteriormente, el ADN se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N+, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), siguiendo modificación del protocolo descrito por Southern (Southern, 1975). La transferencia se llevó a cabo utilizando solución SSC 10X y papel absorbente que se dispuso encima del gel de agarosa y la membrana de nylon. Gracias a la fuerza de capilaridad que ejerce el flujo de solución hacia el papel absorbente, los fragmentos de ADN pasan desde el gel a la membrana uniéndose a ella. La transferencia se realizó durante toda la noche. El ADN transferido a la membrana se fijó mediante irradiación con luz UV Stratalink (Stratagene, San Diego, CA, USA), la membrana fue transferida a un tubo de hibridación y se prehibridó con 25 mL de tampón de prehibridación (SSC 5X, N-lauril-sarcosina 0,1%, SDS 0,02% y Blocking Reagent 1%), durante 1 hora a 65°C. La detección específica de los fragmentos de ADN se realizó usando digoxigenina (DIG). Los fragmentos de ADN marcados que se usaron como sonda se generaron mediante PCR, usando el kit PCR DIG and labeling mix (Roche Diagnostics). La prehibridación fue seguida de un paso de hibridación, en la cual la sonda se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos y se añadió al tampón de prehibridación, incubándose durante 16 horas a 65°C. Una vez hibridado, se procedió a lavar la membrana dos veces durante 5 minutos con tampón de lavado 2X (SSC 2X, SDS 0,1%) a temperatura ambiente, y posteriormente otras dos veces durante 15 minutos con tampón de lavado 0,1X (SSC 0,5X, SDS 0,1%) a 65°C. Los siguientes pasos se llevaron a cabo según el protocolo para Southern blot descrito por (Sambrook & Russell, 2001). Para la detección de la quimioluminiscencia se utilizó el equipo de detección Intelligent Dark Box II (Fujifilm, Tokio, Japón).

Para eliminar la sonda unida al ADN de la membrana, ésta se lavó con solución 0,1X SSC y SDS 0,1% en ebullición por dos veces. Se incubó la membrana durante al menos 15 minutos en agitación, y finalmente se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre papel de filtro.

6. Métodos bioquímicos

6.1. Ensayos de actividad proteolítica

Para la detección de actividad proteolítica se utilizó el kit comercial Pierce Colorimetric Protease Assay kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se crecieron los cultivos en distintos tipos de medio líquido como PDB, medio mínimo suplementado con sacarosa al 1% (p/V) o medio de extracto de hoja de maíz, a 25°C y 140 r.p.m., durante 4 días. Pasado este tiempo, los sobrenadantes se filtraron utilizando embudos con doble gasa previamente esterilizados, y se recolectaron en un tubo Falcon de 50 mL para llevar a cabo los ensayos de actividad proteolítica. Para ello, se incubaron 200 µL de sobrenadante con 100 µL de caseína succinilada, que funciona como sustrato universal de proteasas. Se añadieron 100 µL de tampón de ensayo borato 50 mM pH=8,5 y las mezclas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para cada tipo de muestra se preparó una muestra blanco sin el sobrenadante que sirvió de control de la reacción. Pasado este tiempo, se añadieron 50 µL de TNBSA (ácido sulfónico 2, 4, 6-trinitrobenzeno) 5% (p/V) en metanol a cada una de las muestras, y se incubaron 20 minutos más a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 (Shimadzu, Tokio, Japón). De esta forma, el incremento en la absorbancia producida en las muestras con respecto a sus blancos es debido a la actividad proteolítica.

Alternativamente, se utilizó otro tipo de sustrato para proteasas denominado caseína marcada con resorufina (RLC) (Roche Diagnostics). Las reacciones se llevaron a cabo de forma similar a la forma descrita por (Jousson *et al.*, 2004), utilizando 200 µL de sobrenadante de cultivo líquido, 50 µL de tampón tris HCl 250 mM a pH=7,5 y 50 µL de sustrato RLC 0,2% (p/V). Se incubaron a 37°C durante 2 horas y posteriormente se añadieron 200 µL de ácido tricloroacético 12% (V/V) para detener la reacción. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos más y se midieron las absorbancias a 574 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

6.2. Extracción de proteínas a partir de tejido vegetal

La extracción de proteínas totales a partir de tejido de maíz inoculado con *C. graminicola* se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de (Lange *et al.*, 1996). Para ello, se trituró el tejido previamente congelado en mortero con N₂ líquido y el polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL, hasta llenarlo aproximadamente a la mitad. Se agregó el tampón de extracción (glicerol 10 % (V/V), Triton X-100 0.01% (V/V), tampón sodio acetato 0,1 M pH=4,5 y β-mercaptoetanol 2 mM (V/V)) y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó 20 minutos a 13.000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante con las proteínas.

6.3. Determinación de proteínas por Bradford

La concentración de proteínas en los extractos fue determinada siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), con BSA como estándar.

6.4. Ensayos de actividad quitinasa

Para realizar el ensayo de actividad quitinasa nos basamos en el protocolo previamente descrito por (Ren *et al.*, 2000), en el cual se utiliza 4 metilumbeliferil-β-D-N, N', N''- triacetilquitotriósido hidrato (Sigma-Aldrich) como sustrato fluorogénico artificial para las endoquitinasas. Así, 200 μL de las muestras de extractos proteicos previamente extraídos se incubaron durante 1 hora a 37°C, junto con solución tampón acetato de sodio 50 mM y 10 μL de sustrato 4 metilumbeliferil-β-D-N, N',N''- triacetilquitotriósido hidrato. Al cabo de este tiempo, la reacción se detuvo con 100 μL de hidróxido de sodio 0,1 M. Es importante denotar que las endoquitinasas son activas entre pH=3,0 a 9,0 mientras que el rango de actividad de las exoquitinasas oscila entre un pH=6,0 a 8,0. Las mediciones de la fluorescencia emitida por las muestras fueron hechas en un espectrofluorómetro con lector de placas "Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader" (BioTek, Winooski, VT, USA), fijando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Una unidad de actividad fue definida como el cambio en la fluorescencia de 5 por minuto. Se realizaron tres ensayos independientes con duplicados de cada muestra, además de incluir una muestra blanco que sirvió como control de la reacción.

7. Métodos en planta

7.1. Variedades de maíz (*Zea mays* sp.)

Para los ensayos de infección se utilizó la variedad de maíz Mo940. Esta línea de maíz homocigota Mo940 (Warren, 1976; Warren & others, 1977) se clasifica como altamente susceptible a *C. graminicola*.

7.2. Cultivo de *Z. mays*

Las semillas de maíz se esterilizaron previamente con fungicida FLINT[®] 50WG (trifloxisfrobina) (BayerCropScience, Leverkusen, Alemania) a una concentración de 8 mg/ 10 gr de semillas. Esto se disolvió en 0,5 mL de agua destilada y se añadió a las semillas dispuestas en un tubo Falcon, agitando en vórtex para que toda la superficie de las semillas se recubra de la mezcla fungicida. Se mantuvo durante toda la noche y al día siguiente se lavaron con agua destilada estéril 5 veces, para eliminar cualquier resto de fungicida. Se dejaron sumergidas en agua destilada estéril durante 2 horas para mejorar la eficiencia de germinación y finalmente se incubaron a 25°C durante 4 días en un recipiente de plástico con papel absorbente humedecido hasta su germinación.

Todas las plantas de maíz se cultivaron en invernadero durante 2-3 semanas, hasta que las plantas estuvieron en estadio V-3, con la tercera hoja completamente desplegada. Para ello, se utilizaron conos amarillos de 20 cm de longitud, que se rellenaron con una mezcla de tierra-vermiculita 2:1. Las plantas se regaron cada dos días con agua y se fertilizaron semanalmente con una mezcla de agua y fertilizante Peter's (2 g/L). Las plantas se mantuvieron a una temperatura constante de 25°C y condiciones de luz normales.

7.3. Infección en hojas de *Z. mays* con *C. graminicola*

Los aislados de *C. graminicola* utilizados para llevar a cabo las infecciones en maíz fueron crecidos en placas de PDA durante 15 días a 23°C, bajo iluminación continua con luz blanca, según se describe previamente (Sukno *et al.*, 2008b; Vargas *et al.*, 2012). Las esporas fueron extraídas desde placa de PDA siguiendo la técnica descrita

previamente y se contaron utilizando una cámara Thoma. Finalmente, se realizaron diluciones a una concentración de trabajo de $3,5 \times 10^5$ esporas/mL o 10^6 sp/mL y se añadió 1 μ L de solución Tween 20 1% (V/V), para facilitar su posterior adhesión a la hoja.

Las plantas de maíz se dispusieron en bandejas de plástico de unas dimensiones de 90 cm x 35 cm. Éstas bandejas se recubrieron de papel absorbente humedecido con agua, y se dispusieron dos plantas en posición tumbada por bandeja, dejando el haz hacia arriba. La tercera hoja de cada planta se utilizó para realizar las inoculaciones, y el haz se mantuvo fijo a la bandeja con ayuda de tiras de papel celofán dispuesto sobre los bordes. Una vez fijada la hoja, se procedió a inocular la suspensión de esporas. Se inocularon diez gotas de 7,5 μ L de suspensión de esporas en el limbo de cada hoja, a ambos lados de la nervadura central, y posteriormente se recubrió la bandeja con papel film de plástico adherente, procurando sellar completamente la bandeja para evitar pérdidas de humedad. Las bandejas con las plantas se incubaron a 25°C con fotoperiodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, durante distinto tiempo dependiendo del tipo de experimento.

7.4. Infección en raíces de *Z. mays* con *C. graminicola*

Los aislados fueron crecidos sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μ m (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia) dispuesta el centro de una placa de PDA. Estas placas se mantuvieron a 23°C y bajo luz blanca continua, durante 15 días. Paralelamente, se germinaron semillas de maíz en las condiciones previamente descritas durante 5 días, hasta que éstas desarrollaron una raíz de 5 cm de longitud aproximadamente.

En un recipiente plástico estéril con papel absorbente humedecido en su interior se dispusieron las semillas de maíz, y sobre las raíces de éstas se colocaron 4 o 5 trozos de membrana de nitrocelulosa recubierta de micelio, de unos 0,5 cm² aproximadamente, dependiendo de la longitud de la raíz. Una vez sellado, el recipiente se incubó a 25°C en oscuridad durante 6 o 12 días, según el grado de infección deseado.

7.5. Cuantificación de los síntomas de infección con *C. graminicola*

Las lesiones formadas en las hojas de maíz inoculadas se cuantificaron con el software Paint.NET 4.0.3 (dotPDN LCC), obteniéndose una medida en píxeles que posteriormente se convirtió a mm². El criterio seguido para esta cuantificación se basó en seleccionar únicamente la zona necrótica de cada lesión, sin tener en cuenta las lesiones cloróticas que pudieran aparecer alrededor de la zona de necrosis.

8. Tinción, microscopía y análisis de imagen

8.1. Microscopía confocal

Todos los análisis confocales se realizaron con el microscopio laser confocal TCS SP2 (Leica, Wetzlar, Alemania). Los canales láser y las longitudes de onda de excitación y detección utilizadas se encuentran descritos en la **Tabla 8**.

El control del microscopio se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El posterior procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con los softwares Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Alemania) e ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, (<http://imagej.nih.gov/ij/>), 1997-2014).

Detección	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión	Tipo de láser
WGA-AF488	488 nm	490-540 nm	Argón
GFP	488 nm	495-520 nm	Argón
Yoduro de propidio/ Autofluorescencia de la pared celular	561 nm	570-640 nm	561 DPSS

Tabla 8: Láseres usados y longitudes de onda de excitación y emisión.

8.2. Tinción con yoduro de propidio

Para la tinción con yoduro de propidio, las raíces se cortaron con una cuchilla lo más finamente posible, tanto de forma longitudinal como transversal. Los cortes se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de yoduro de propidio 10% (V/V), durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el exceso de yoduro de propidio y los cortes se montaron en un portaobjetos con glicerol 30% (V/V) para su visualización.

8.3 Tinción WGA-AF488/yoduro de propidio

Para la tinción de hojas de maíz inoculadas con *C. graminicola* se utilizó el reactivo WGA (Wheat Germ Agglutinin) (ThermoFisher Scientific). Las hojas de maíz se recolectaron y se destiñeron en etanol 100% (V/V) durante una noche a 4°C, para eliminar completamente la clorofila. Este periodo se puede alargar hasta 24 horas si fuera necesario, en cuyo caso se debe sustituir el etanol. Más tarde, las hojas fueron incubadas durante 5 minutos en una solución de KOH al 10% (p/V), previamente calentada a 85°C. Posteriormente, las muestras se lavan 4 veces con PBS 1X (pH=7.4) y se añade la solución de tinción. Los lavados con PBS 1X son necesarios para disminuir el pH a un punto neutral, en el cual es más eficiente la tinción WGA. Las muestras se infiltran mediante vacío 5 veces durante 3 minutos, utilizando el Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (ThermoFisher Scientific), se destiñen con PBS 1X y se incuban a 4°C durante toda la noche para su posterior visionado al día siguiente.

Solución stock WGA-AF488	1 mg/ml en H ₂ O. Almacenar a 4°C
Solución stock yoduro de propidio	10 mg/ml en PBS (pH=7.4). Almacenar a 4°C en oscuridad
PBS 1X (pH=7,4)	KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Na ₂ PO ₄ 8 mM KCl 2,7 mM NaCl 137 mM en H ₂ O destilada

Solución de tinción	Yoduro de propidio 20 µg/ml
	WGA-AF488 10 µg/ml
	Tween 20 0,1%
	en PBS pH=7,4

8.4. Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imagen

Para realizar la microscopía de fluorescencia se utilizó el microscopio Leica DLMB, y las fotografías se obtuvieron con la cámara Leica DC300F adaptada, utilizando el software ACDSee v.3.1b (ACD Systems of America, Inc., Seattle, WA, USA). Se utilizó el filtro que permite la excitación y detección de GFP. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia GFP en hoja y raíz de maíz inoculado con diferentes cepas transformantes GFP, se utilizó el software ImageJ. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, y en cada experimento se recogieron cuatro imágenes para calcular la fluorescencia celular total corregida (TCCF). El TCCF se calculó utilizando la siguiente fórmula: $TCCF = \text{densidad integrada} - (\text{área de selección} \times \text{media de fluorescencia de las lecturas de background})$.

9. Métodos bioinformáticos

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó el software informático **Geneious® R6 versión Pro** (Biomatters, Nueva Zelanda) (Drummond *et al.*, 2011). Los árboles filogenéticos se construyeron usando el programa **MAFFT** (Kato *et al.*, 2002a) para alinear las secuencias, **MODELGENERATOR** (Keane *et al.*, 2006) para identificar el mejor ajuste del modelo de sustitución y **PhyML** (Guindon & Gascuel, 2003) y **MrBayes** (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) para reconstruir los árboles usando el criterio de máxima parsimonia y 100 réplicas en el test bootstrap.

Las búsquedas de secuencias de nucleótidos y proteínas se llevaron a cabo usando la página web **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** (Altschul *et al.*, 1990). Se

utilizaron las bases de datos **Uniprot** (www.uniprot.org), **GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), **Joint Genome Institute** (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>), **DataDryad** (<http://datadryad.org/>), **InterProScan** (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html>) y **Broad Institute** (<http://www.broadinstitute.org/>). Para determinar y clasificar las características evolutivas de las fungalisinas dentro del Reino Hongos, se utilizó la base de datos **OrthoDB** (<http://orthodb.org/>) (Waterhouse *et al.*, 2013). Esta base de datos utiliza genes codificantes de proteínas de especies eucarióticas y bacterias, para clasificarlos en grupos de ortólogos descendientes de un único gen del último ancestro común de cada clado de especies. OrthoDB también proporciona información estimada sobre características evolutivas de ortólogos, tales como perfiles génicos de duplicación/pérdida o tasas de divergencia.

Las secuencias codificantes de péptido señal y localización nuclear fueron predichas mediante los programas **SignalP** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011), **WoLF PSORT** (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) (Horton *et al.*, 2007) y **Euk-mPloc 2.0** (Chou & Shen, 2010). La búsqueda y predicción de promotores de los distintos genes se llevó a cabo con el software informático **Genomatix Software Suite** (www.genomatix.de). La generación de estructuras terciarias se realizó utilizando el servidor **Phyre2** (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley & Sternberg, 2009) y la manipulación de estos modelos mediante el visor molecular **PyMOL (Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC)** (<https://www.pymol.org/>) (Schrödinger, 2010).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa **Statistix 10** (Analytical software, FL, USA). El diseño gráfico y la edición de imágenes se realizó mediante **Adobe Photosop CS6** (San José, CA, USA) y **Microsoft Office Picture Manager** (Microsoft, Redmond, WA, USA). Para la edición bibliográfica se utilizó el programa **Zotero Standalone 4.0**.

REFERENCES

- Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005.** ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104–2105.
- Agrios GN. 2005.** *Plant Pathology*. Academic Press.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783–801.
- Albarouki E, Schaffner L, Ye F, von Wirén N, Haas H, Deising HB. 2014.** Biotrophy-specific downregulation of siderophore biosynthesis in *Colletotrichum graminicola* is required for modulation of immune responses of maize. *Molecular Microbiology* **92**: 338–355.
- Alexander WG, Wisecaver JH, Rokas A, Hittinger CT. 2016.** Horizontally acquired genes in early-diverging pathogenic fungi enable the use of host nucleosides and nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201517242.
- Alkan N, Friedlander G, Ment D, Prusky D, Fluhr R. 2015.** Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist* **205**: 801–815.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Antão CM, Malcata FX. 2005.** Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 637–650.
- Armijos Jaramillo VD, Vargas WA, Sukno SA, Thon MR. 2013a.** Horizontal transfer of a subtilisin gene from plants into an ancestor of the plant pathogenic fungal genus *Colletotrichum*. *PLoS ONE* **8**: e59078.
- Armijos Jaramillo VD, Vargas WA, Sukno SA, Thon MR. 2013b.** New insights into the evolution and structure of *Colletotrichum* plant-like subtilisins (CPLSs). *Communicative & Integrative Biology* **6**: e25727.
- Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15649–15654.
- Azghani AO, Connelly JC, Peterson BT, Gray LD, Collins ML, Johnson AR. 1990.** Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase on alveolar epithelial permeability in guinea pigs. *Infection and Immunity* **58**: 433–438.
- Baek J-M, Kenerley CM. 1998a.** The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: Cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genetics and Biology* **23**: 34–44.
- Baek J-M, Kenerley CM. 1998b.** The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: Cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genetics and Biology* **23**: 34–44.
- Baeza-Montañez L, Gold SE, Espeso EA, García-Pedrajas MD. 2014.** Conserved and distinct functions of the ‘stunted’ (StuA)-homolog *Ust1* during cell differentiation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 86–102.
- Bailey JA, Jeger M. 1978.** *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford, UK: CAB.

- Bailey JA, O'Connell RJ, Pring R J, Nash C. 1992.** Infection strategies of *Colletotrichum* species. *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International, 88–120.
- Balmer D, de Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. 2013.** Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *The Plant Journal* **74**: 213–225.
- Bao Y, Li Y, Jiang Q, Zhao L, Xue T, Hu B, Sun B. 2013.** Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs) of *Staphylococcus aureus* is essential for the virulence independent of LuxS/AI-2 system. *International Journal of Medical Microbiology* **303**: 190–200.
- Baroncelli R, Amby DB, Zapparata A, Sarrocco S, Vannacci G, Le Floch G, Harrison RJ, Holub E, Sukno SA, Sreenivasaprasad S, et al. 2016.** Gene family expansions and contractions are associated with host range in plant pathogens of the genus *Colletotrichum*. *BMC Genomics* **17**: 555.
- Baroncelli R, Zapparata A, Sarrocco S, Sukno SA, Lane CR, Thon MR, Vannacci G, Holub E, Sreenivasaprasad S. 2015.** Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. *PLoS ONE* **10**: e0129140.
- Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Börnke F. 2009.** The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 655–664.
- Bechinger null, Giebel null, Schnell null, Leiderer null, Deising null, Bastmeyer null. 1999.** Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**: 1896–1899.
- Beckers GJ, Conrath U. 2007.** Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 425–431.
- Beilinson V, Moskalenko OV, Livingstone DS, Reverdatto SV, Jung R, Nielsen NC. 2002.** Two subtilisin-like proteases from soybean. *Physiologia Plantarum* **115**: 585–597.
- Bergstrom GC, Nicholson RL. 1999.** The biology of corn anthracnose: Knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* **83**: 596–608.
- Bernard P, Couturier M. 1992.** Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**: 735–745.
- Bernard P, Kezdy, K.E, Van Melderren, L., Steyaert, J. 1993.** The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *Journal of Molecular Biology* **234**: 534–541.
- Bhadauria V, Banniza S, Vandenberg A, Selvaraj G, Wei Y. 2013.** Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryotic Cell* **12**: 2–11.
- Bhadauria V, MacLachlan R, Pozniak C, Banniza S. 2015.** Candidate effectors contribute to race differentiation and virulence of the lentil anthracnose pathogen *Colletotrichum lentis*. *BMC Genomics* **16**: 628.

- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379–406.
- Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, van den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, et al. 2008.** The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**: 119–136.
- Böning K, Wallner F. 1936.** Fußkrankheit und andere Schädigungen an Mais durch *Colletotrichum graminicolum* (Ces.) Wilson. *Phytopath Ztschr* **9**: 99–110.
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I, Taylor RM, Zhendong T, Engelhardt S, Vetukuri RR, Harrower B, et al. 2010.** *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9909–9914.
- Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AME, Huitema E, Hoorn RAL van der, et al. 2011.** *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20832–20837.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. 2001.** Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Medical Mycology* **39**: 269–275.
- Brouta F, Descamps F, Monod M, Vermout S, Losson B, Mignon B. 2002.** Secreted metalloprotease gene family of *Microsporium canis*. *Infection and Immunity* **70**: 5676–5683.
- Brown NA, Urban M, Hammond-Kosack KE. 2015.** The trans-kingdom identification of negative regulators of pathogen hypervirulence. *FEMS Microbiology Reviews*: fuv042.
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, Lorenzo GD. 2010.** A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 9452–9457.
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, de Wit PJGM. 2006.** *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1420–1430.
- Büttner D. 2016.** Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*: In press.
- Caillaud M-C, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, de Almeida Engler J, Abad P, Rosso M-N, Favery B. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* **165**: 104–113.
- Caillaud M-C, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N, Beynon J, Jones JDG. 2012.** Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated

protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility: Subcellular localization of Hpa effector repertoire. *The Plant Journal* **69**: 252–265.

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* **73**: 181–213.

Cannon PF, Simmons CM. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* **94**: 210–220.

Canonne J, Rivas S. 2012. Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 217–221.

Casadaban MJ, Cohen SN. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **138**: 179–207.

Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, et al. 2013. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant Cell* **25**: 1463–1481.

Chalfoun NR, Grellet-Bournonville CF, Martinez-Zamora MG, Diaz-Perales A, Castagnaro AP, Diaz-Ricci JC. 2013. Purification and characterization of AsES protein: a subtilisin secreted by *Acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 14098–14113.

Chaudet MM, Naumann TA, Price NPJ, Rose DR. 2014. Crystallographic structure of ChitA, a glycoside hydrolase family 19, plant class IV chitinase from *Zea mays*. *Protein Science* **23**: 586–593.

Chaudhari P, Ahmed B, Joly DL, Germain H. 2014. Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. *Virulence* **5**: 703–709.

Chen L-H, Yang SL, Chung K-R. 2014. Resistance to oxidative stress via regulating siderophore-mediated iron acquisition by the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Microbiology* **160**: 970–979.

Chichkova NV, Kim SH, Titova ES, Kalkum M, Morozov VS, Rubtsov YP, Kalinina NO, Taliansky ME, Vartapetian AB. 2004. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell* **16**: 157–171.

Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, Drury GE, Tuzhikov AI, Kim SH, Kalkum M, Hong TB, Gorshkova EN, Torrance L, et al. 2010. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *The EMBO Journal* **29**: 1149–1161.

Chichkova NV, Tuzhikov AI, Taliansky M, Vartapetian AB. 2012. Plant phytaspases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. *Physiologia Plantarum* **145**: 77–84.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803–814.

Chou K-C, Shen H-B. 2010. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS ONE* **5**: e9931.

- Christ U, Möisinger E. 1989.** Pathogenesis-related proteins of tomato: I. Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlations with resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**: 53–65.
- Coffeen WC, Wolpert TJ. 2004.** Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell* **16**: 857–873.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad1 K. 1993.** Plant chitinases. *The Plant Journal* **3**: 31–40.
- Conrath U. 2011.** Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* **16**: 524–531.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, et al. 2006.** Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1062–1071.
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. 2002.** Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**: 210–216.
- Cota LV, da Costa RV, Silva DD, Casela CR, Parreira DF. 2012.** Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in brazilian conditions. *Journal of Phytopathology* **160**: 680–684.
- Crouch JA, Beirn LA. 2009.** Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* **39**: 19.
- Crouch J, O’Connell R, Gan P, Buiate E, Torres MF, Beirn L, Shirasu K, Vaillancourt L. 2014.** The genomics of *Colletotrichum*. Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 69–102.
- Crouch JA, Tredway LP, Clarke BB, Hillman BI. 2009.** Phylogenetic and population genetic divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. *Molecular Ecology* **18**: 123–135.
- Cuming AC. 2009.** Plant–pathogen interactions: a view from the evolutionary basement. *New Phytologist* **183**: 237–239.
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ. 2013.** Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**.
- Dangl JL, Jones JDG. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.
- Dawkins R, Krebs JR. 1979.** Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **205**: 489–511.
- Dean R, Van Kan J a. L, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. 2012.** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414–430.
- Delaunoy B, Jeandet P, Clément C, Baillieul F, Dorey S, Cordelier S. 2014.** Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Plant-Microbe Interaction* **5**: 249.

- Dickman MB. 2000.** *Colletotrichum*. Fungal Pathology. Dordrecht: Kluwer Academic, 127–148.
- Dixon RA, Lamb and CJ. 1990.** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 339–367.
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, et al. 2011.** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395–398.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010.** Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.
- Dodson G, Wlodawer A. 1998.** Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 347–352.
- Doehlemann G, Hemetsberger C. 2013.** Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* **198**: 1001–1016.
- Doehlemann G, Reissmann S, Aßmann D, Fleckenstein M, Kahmann R. 2011.** Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular Microbiology* **81**: 751–766.
- Doehlemann G, Requena N, Schaefer P, Brunner F, O’Connell R, Parker JE. 2014.** Reprogramming of plant cells by filamentous plant-colonizing microbes. *New Phytologist* **204**: 803–814.
- Doehlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kühnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, et al. 2008.** Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal* **56**: 181–195.
- Donofrio NM, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown DE, Jeong JS, Coughlan S, Mitchell TK, Dean RA. 2006.** Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 605–617.
- Dou D, Zhou J-M. 2012.** Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host & Microbe* **12**: 484–495.
- Dow M, Newman M-A, von Roepenack E. 2000.** The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 241–261.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, et al. 2011.** *Geneious v5.5*.
- Du Y, Stegmann M, Misas Villamil JC. 2016.** The apoplast as battleground for plant–microbe interactions. *New Phytologist* **209**: 34–38.
- Dutheil JY, Mannhaupt G, Schweizer G, M.K. Sieber C, Münsterkötter M, Güldener U, Schirawski J, Kahmann R. 2016.** A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biology and Evolution* **8**: 681–704.

- El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher BM, Deising HB. 2002.** Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist* **156**: 103–112.
- Erbs G, Newman M-A. 2012.** The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* **13**: 95–104.
- Escoll P, Mondino S, Rolando M, Buchrieser C. 2016.** Targeting of host organelles by pathogenic bacteria: a sophisticated subversion strategy. *Nature Reviews Microbiology* **14**: 5–19.
- van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2007.** The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1092–1101.
- van Esse HP, Van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2008.** The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* **20**: 1948–1963.
- Fang G-C, Hanau RM, Vaillancourt LJ. 2002.** The *SOD2* gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **36**: 155–165.
- Farman ML. 2007.** Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the world of the end as we know it. *FEMS Microbiology Letters* **273**: 125–132.
- Felix G, Boller T. 2003.** Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 6201–6208.
- Felix G, Regenass M, Boller T. 1993.** Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**: 307–316.
- Fernández MB, Daleo GR, Guevara MG. 2015.** Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTc-3). *Plant Physiology and Biochemistry* **86**: 137–146.
- Fernández D, Russi S, Vendrell J, Monod M, Pallarès I. 2013.** A functional and structural study of the major metalloprotease secreted by the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **69**: 1946–1957.
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G. 2013.** Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Plant Physiology* **4**: 49.
- Figueiredo A, Monteiro F, Sebastiana M. 2014.** Subtilisin-like proteases in plant–pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Plant Biotic Interactions* **5**: 739.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. 2012.** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186–194.

- Flood J. 2010.** The importance of plant health to food security. *Food Security* **2**: 215–231.
- Flor HH. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296.
- Frandsen RJ, Andersson JA, Kristensen MB, Giese H. 2008.** Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Molecular Biology* **9**: 70.
- Frey TJ, Weldekidan T, Colbert T, Wolters PJCC, Hawk JA. 2011.** Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. using near-isogenic maize hybrids. *Crop Science* **51**: 1551.
- Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Kouzai Y, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T, Nishimura M. 2012.** Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathogens* **8**: e1002882.
- Galletti R, De Lorenzo G, Ferrari S. 2009.** Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 33–34.
- Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka M, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K. 2013.** Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist* **197**: 1236–1249.
- García-Pedrajas MD, Nadal M, Kapa LB, Perlin MH, Andrews DL, Gold SE. 2008a.** DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 379–388.
- García-Pedrajas MD, Nadal M, Kapa LB, Perlin MH, Andrews DL, Gold SE. 2008b.** DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal genetics and biology: FG & B* **45**: 379–388.
- Gardiner DM, Kazan K, Manners JM. 2013.** Cross-kingdom gene transfer facilitates the evolution of virulence in fungal pathogens. *Plant Science* **210**: 151–158.
- Gawehns F, Cornelissen BJC, Takken FLW. 2013.** The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbial Biotechnology* **6**: 223–229.
- Gazis R, Rehner S, Chaverri P. 2011.** Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology* **20**: 3001–3013.
- Giddey K, Monod M, Barblan J, Potts A, Waridel P, Zaugg C, Quadroni M. 2007.** Comprehensive Analysis of Proteins Secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in Vitro Conditions. *Journal of Proteome Research* **6**: 3081–3092.
- Giraldo MC, Valent B. 2013.** Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 800–814.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.

- Göhre V, Robatzek S. 2008.** Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 189–215.
- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. 2013.** *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **31**: 1–41.
- Gong X, Hurtado O, Wang B, Yi M, Giraldo M, Wu C, Valent B, Goodin MM, Farman M. 2014.** pPFL vectors for high-throughput protein localization in fungi: detecting cytoplasmic accumulation of putative effector proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 107–121.
- Gottig N, Garavaglia BS, Daurelio LD, Valentine A, Gehring C, Orellano EG, Ottado J. 2008.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 18631–18636.
- Granel A, Bellés JM, Conejero V. 1987.** Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**: 83–90.
- Gregory PJ, Johnson SN, Newton AC, Ingram JS. 2009.** Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2827–2838.
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010.** New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307–321.
- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Gust AA. 2015.** Peptidoglycan perception in plants. *PLoS Pathog* **11**: e1005275.
- Gust AA, Willmann R, Desaki Y, Grabherr HM, Nürnberger T. 2012.** Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science* **17**: 495–502.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, et al. 2009.** Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393–398.
- Hammerschmidt R. 1999.** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 77–84.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557–580.
- Hann D, Boller T, Martin F, Kamoun S. 2012.** Microbial effectors and their role in plant defense suppression. Wiley-Blackwell: Chichester, UK.
- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. 2012.** The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* **8**: e1002684.
- Henrissat B, Bairoch A. 1993.** New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **293**: 781–788.

- Hicks SW, Galán JE. 2013. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 316–326.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 115–122.
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising HB. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **168**: 51–62.
- Hori T, Kumasaka T, Yamamoto M, Nonaka T, Tanaka N, Hashimoto Y, Ueki T, Takio K. 2001. Structure of a new ‘aspzincin’ metalloendopeptidase from *Grifola frondosa*: implications for the catalytic mechanism and substrate specificity based on several different crystal forms. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **57**: 361–368.
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* **35**: W585–W587.
- Hou S, Yang Y, Wu D, Zhang C. 2011. Plant immunity. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 794–799.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, *et al.* 2009. *Colletotrichum*—names in current use. *Fungal Diversity* **39**: 147–182.
- Impacts of the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. APS Features. 2013. *APSnet Feature Articles*.
- Innan H, Kondrashov F. 2010. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics* **11**: 97–108.
- Inouye M. 1991. Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**: 314–321.
- Irfan M, Ting Ting Z, Yang W, Chunyu Z, Quing M, Zhang L, Feng L. 2013. Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research Journal of Biotechnology* **8**: 41–45.
- Irieda H, Maeda H, Akiyama K, Hagiwara A, Saitoh H, Uemura A, Terauchi R, Takano Y. 2014. *Colletotrichum orbiculare* secretes virulence effectors to a biotrophic interface at the primary hyphal neck via exocytosis coupled with SEC22-mediated traffic. *The Plant Cell* **26**: 2265–2281.
- Jamil FF, Nicholson RL. 1991. Response of sorghum lines of different ages to *Colletotrichum graminicola* isolates from shattercane, sorghum and corn. *Pakistan Journal of Phytopathology* **3**: 12–18.
- Jaton-Ogay K, Paris S, Huerre M, Quadroni M, Falchetto R, Togni G, Latgé J-P, Monod M. 1994. Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* **14**: 917–928.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal* **19**: 4004–4014.

- Joly DL, Feau N, Tanguay P, Hamelin RC. 2010.** Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora spp.*). *BMC Genomics* **11**: 422.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- de Jonge R, Bolton MD, Kombrink A, Berg GCM van den, Yadeta KA, Thomma BPHJ. 2013.** Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research* **23**: 1271–1282.
- de Jonge R, Bolton MD, Thomma BP. 2011.** How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 400–406.
- de Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ. 2010.** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953–955.
- de Jonge R, Esse HP van, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, et al. 2012.** Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 5110–5115.
- de Jonge R, Thomma BPHJ. 2009.** Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* **17**: 151–157.
- Joshi L, Leger RJS, Bidochka MJ. 1995.** Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* **125**: 211–217.
- Jousson O, Léchenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, Quadroni M, Monod M. 2004.** Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporium*. *Microbiology* **150**: 301–310.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiya C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006.** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11086–11091.
- Kamenidou S, Jain R, Hari K, Robertson JM, Fletcher J. 2013.** The microbial rosetta stone central agricultural database: An information resource on high-consequence plant pathogens. *Plant Disease* **97**: 1097–1102.
- Kamoun S. 2006.** A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual review of phytopathology* **44**: 41–60.
- Kamoun S. 2007.** Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 358–365.
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, et al. 2006.** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97–101.

- Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, Alaux L, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal* **72**: 894–907.
- Karimi Jashni M, Dols IHM, Iida Y, Boeren S, Beenen HG, Mehabi R, Collemare J, De Wit PJGM. 2015. Synergistic action of serine- and metallo-proteases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity and enhances fungal virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 996–1008.
- Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S, Gu C, Ilyas M, Win J, Kamoun S, van der Hoorn RAL. 2010. An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiology* **154**: 1794–1804.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* **8**: 809–824.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002a. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059–3066.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002b. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059–3066.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772–780.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 29.
- Kelley BS, Lee S-J, Damasceno CMB, Chakravarthy S, Kim B-D, Martin GB, Rose JKC. 2010. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *The Plant Journal* **62**: 357–366.
- Kelley LA, Sternberg MJE. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**: 363–371.
- Kemen E, Kemen A, Ehlers A, Voegelé R, Mendgen K. 2013. A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. *The Plant Journal* **75**: 767–780.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1130–1139.
- Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park S-Y, Czymmek K, Kang S, Valent B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell* **22**: 1388–1403.
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D. 2005. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749–759.

- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin J-C, Kopp M, Kloareg B, Fritig B. 2000.** Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* **124**: 1027–1038.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, van Themaat EVL, van der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, Schmalenbach W, et al. 2012.** Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens* **8**: e1002643.
- Kleemann J, Takahara H, Stuber K, O'Connell R. 2008.** Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. *Microbiology* **154**: 1204–1217.
- Koeck M, Hardham AR, Dodds PN. 2011.** The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology* **13**: 1849–1857.
- Kombrink A. 2014.** *Functional analysis of LysM effectors secreted by fungal plant pathogens (Ph.D Thesis)*. Wageningen University.
- Kombrink A, Sánchez-Vallet A, Thomma BPHJ. 2011.** The role of chitin detection in plant–pathogen interactions. *Microbes and Infection* **13**: 1168–1176.
- Kombrink A, Thomma BPHJ. 2013.** LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. *PLoS Pathog* **9**: e1003769.
- Kreger AS, Gray LD. 1978.** Purification of *Pseudomonas aeruginosa* proteases and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage. *Infection and Immunity* **19**: 630–648.
- Krijger J-J, Horbach R, Behr M, Schweizer P, Deising HB, Wirsal SGR. 2008.** The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1325–1336.
- Kubo Y, Takano Y. 2013.** Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology* **79**: 233–242.
- Kuč J. 1982.** Induced immunity to plant disease. *BioScience* **32**: 854–860.
- Kunkel BN, Brooks DM. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325–331.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004.** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **16**: 3496–3507.
- Landy A. 1989.** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 913–941.
- Lange J, Mohr U, Wiemken A, Boller T, Vogeli-Lange R. 1996.** Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. *Plant Physiology* **111**: 1135–1144.
- Latunde-Dada AO. 2001.** *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* **2**: 187–198.

- Latunde-Dada AO, Lucas JA. 2007.** Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology* **56**: 437–447.
- Lawton MA, Lamb CJ. 1987.** Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 335–341.
- LeBeau FJ. 1950.** Pathogenicity studies with *Colletotrichum* from different hosts on sorghum and sugarcane. *Phytopathology* **40**: 430–438.
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F, Tjamos SE, Metraux J-P. 2015.** Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* **112**: 54–62.
- Leister D. 2004.** Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in Genetics* **20**: 116–122.
- Leng W, Liu T, Wang J, Li R, Jin Q. 2009.** Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. *Medical Mycology* **47**: 759–765.
- Lewis DH. 1973.** Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol Rev* **48**: 261–278.
- Liao C-Y, Chen M-Y, Chen Y-K, Kuo K-C, Chung K-R, Lee M-H. 2012.** Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum spp.* *Plant Pathology* **61**: 262–270.
- Li J, Yu L, Tian Y, Zhang K-Q. 2012.** Molecular evolution of the deuterolysin (M35) family genes in *Coccidioides*. *PLoS ONE* **7**: e31536.
- Li J, Zhang K-Q. 2014.** Independent expansion of zincin metalloproteinases in *Onygenales* fungi may be associated with their pathogenicity. *PLoS ONE* **9**: e90225.
- Lin Y, Zhang C, Lan H, Gao S, Liu H, Liu J, Cao M, Pan G, Rong T, Zhang S. 2014.** Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PLoS ONE* **9**: e95445.
- Linde K van der, Hemetsberger C, Kastner C, Kaschani F, Hoorn RAL van der, Kumlehn J, Doehlemann G. 2012.** A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastcysteine proteases. *The Plant Cell* **24**: 1285–1300.
- Lipps PE. 1983.** Survival of *Colletotrichum graminicola* in infested corn residues in Ohio. *Plant Disease* **67**: 102.
- Lipps PE. 1988.** Spread of corn anthracnose from surface residues in continuous corn and cornsoybean rotation plots. *Phytopathology* **78**: 756–761.
- Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z, Wang G-L. 2013.** Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* **6**: 605–620.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* **4**: 357–362.

- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 513–545.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.
- Lozano-Torres JL, Wilbers RHP, Gawronski P, Boshoven JC, Finkers-Tomczak A, Cordewener JHG, America AHP, Overmars HA, Klooster JWV 't, Baranowski L, et al. 2012. Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 10119–10124.
- Lozano-Torres JL, Wilbers RHP, Warmerdam S, Finkers-Tomczak A, Diaz-Granados A, van Schaik CC, Helder J, Bakker J, Goverse A, Schots A, et al. 2014. Apoplastic venom allergen-like proteins of Cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors. *PLoS Pathogens* **10**: e1004569.
- Lucy AP, Guo H-S, Li W-X, Ding S-W. 2000. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal* **19**: 1672–1680.
- Luo X, Hofmann K. 2001. The protease-associated domain: a homology domain associated with multiple classes of proteases. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 147–148.
- Luttrell ES. 1974. Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* **66**: 1–15.
- Lyerly D, Gray L, Kreger A. 1981. Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia keratitis* and by a *Serratia* protease. *Infect. Immun.* **33**: 927–932.
- Ma L-J, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M-J, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367–373.
- Macho AP. 2016. Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist* **210**: 51–57.
- Macho AP, Zipfel C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* **54**: 263–272.
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL. 2003. *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379–389.
- Mahon P, Bateman A. 2000. The PA domain: A protease-associated domain. *Protein Science* **9**: 1930–1934.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**: 403–410.

- Maor R, Puyesky M, Horwitz BA, Sharon A. 1998.** Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research* **102**: 491–496.
- Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H, Paszkowski U. 2010.** Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **22**: 3177–3187.
- Marian CO, Bordoli SJ, Goltz M, Santarella RA, Jackson LP, Danilevskaya O, Beckstette M, Meeley R, Bass HW. 2003.** The maize single myb histone 1 gene, *Smh1*, belongs to a novel gene family and encodes a protein that binds telomere DNA repeats *in vitro*. *Plant Physiology* **133**: 1336–1350.
- Markaryan A, Morozova I, Yu H, Kolattukudy PE. 1994.** Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infection and Immunity* **62**: 2149–2157.
- Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack KE, Thomma BPHJ, Rudd JJ. 2011.** Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel punctual properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiology* **156**: 756–769.
- Mathy A, Baldo A, Schoofs L, Cambier L, Defaweux V, Tabart J, Maréchal F, Symoens F, Mignon B. 2010.** Fungalytin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporium canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. *Veterinary Microbiology* **146**: 179–182.
- Mba C, Guimaraes EP, Ghosh K. 2012.** Re-orienting crop improvement for the changing climatic conditions of the 21st century. *Agriculture and Food Security* **1**.
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW. 2006.** Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* **7**: 212.
- Mehdy MC. 1994.** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* **105**: 467–472.
- Meichtry J, Amrhein N, Schaller A. 1999.** Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology* **39**: 749–760.
- Mendgen K, Hahn M. 2002.** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* **7**: 352–356.
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BPHJ, et al. 2012.** Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell* **24**: 322–335.
- Mesarich CH, Stergiopoulos I, Beenen HG, Cordovez V, Guo Y, Karimi Jashni M, Bradshaw RE, de Wit PJGM. 2016.** A conserved proline residue in Dothideomycete Avr4 effector proteins is required to trigger a Cf-4-dependent hypersensitive response. *Molecular Plant Pathology* **17**: 84–95.

- Messiaen CM, Lapon R, Molot P. 1960.** Root necroses, stalle rots, and parasitic lodging of maize. *Annual Epiphyte* **10**: 441–474.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW. 2003.** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 809–834.
- Mims CW, Vaillancourt LJ. 2002.** Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology* **92**: 803–812.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. 2007.** CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 19613–19618.
- Miyoshi S. 2013.** Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic vibrio species. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Miyoshi S, Nakazawa H, Kawata K, Tomochika K, Tobe K, Shinoda S. 1998.** Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infection and Immunity* **66**: 4851–4855.
- Miyoshi S, Shinoda S. 2000.** Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection* **2**: 91–98.
- Monod M. 2008.** Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* **166**: 285–294.
- Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. 2002.** Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology* **292**: 405–419.
- Monod M, Paris S, Sanglard D, Jatton-Ogay K, Bille J, Latge JP. 1993.** Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **61**: 4099–4104.
- Mueller AN, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, Doehlemann G. 2013.** Compatibility in the *Ustilago maydis*–maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**: e1003177.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**: 263–273.
- Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB. 2008.** The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology* **165**: 41–51.
- Munkvold GP. 2002.** Managing anthracnose stalk rot: a moving target. *Proc. 56th annual corn and sorghum research conference*: 196–206.
- Murray MG, Thompson WF. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**: 4321–4325.
- Naumann TA, Price NPJ. 2012.** Truncation of class IV chitinases from *Arabidopsis* by secreted fungal proteases. *Molecular Plant Pathology* **13**: 1135–1139.

- Naumann TA, Wicklow DT. 2010a.** Allozyme-specific modification of a maize seed chitinase by a protein secreted by the fungal pathogen *Stenocarpella maydis*. *Phytopathology* **100**: 645–654.
- Naumann TA, Wicklow DT. 2010b.** Allozyme-specific modification of a maize seed chitinase by a protein secreted by the fungal pathogen *Stenocarpella maydis*. *Phytopathology* **100**: 645–654.
- Naumann TA, Wicklow DT. 2013a.** Chitinase modifying proteins from phylogenetically distinct lineages of Brassica pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **82**: 1–9.
- Naumann TA, Wicklow DT. 2013b.** Chitinase modifying proteins from phylogenetically distinct lineages of Brassica pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **82**: 1–9.
- Naumann TA, Wicklow DT, Kendra DF. 2009.** Maize seed chitinase is modified by a protein secreted by *Bipolaris zeicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**: 134–141.
- Naumann TA, Wicklow DT, Price NPJ. 2011.** Identification of a chitinase-modifying protein from *Fusarium verticillioides* truncation of a host resistance protein by a fungalysin metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 35358–35366.
- Newman M-A, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G. 2013.** MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Plant-Microbe Interaction* **4**: 139.
- Newman M-A, Von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM. 2002.** Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal* **29**: 487–495.
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY. 2006.** A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**: 220–223.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249–266.
- O’Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiaite EA, Epstein L, Alkan N, et al. 2012.** Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* **44**: 1060–1065.
- Oerke EC. 2006.** Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **144**: 31–43.
- Ökmen B, Doehlemann G. 2014.** Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 19–25.
- Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt TO, Chaparro-Garcia A, Segretin ME, Stam R, Schornack S, Cano LM, et al. 2010.** Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology* **12**: 705–715.
- Oliveira-Garcia E, Deising HB. 2013.** Infection structure-specific expression of β -1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucan-triggered immunity in maize. *The Plant Cell Online* **25**: 2356–2378.

- Olivieri F, Zanetti ME, Oliva CR, Covarrubias AA, Casalongué CA. 2002.** Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 63–72.
- Olukolu BA, Wang G-F, Vontimitta V, Venkata BP, Marla S, Ji J, Gachomo E, Chu K, Negeri A, Benson J, et al. 2014.** A genome-wide association study of the maize hypersensitive defense response identifies genes that cluster in related pathways. *PLoS Genetics* **10**: e1004562.
- Page MJ, Di Cera E. 2008.** Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**: 1220–1236.
- Palaversic B, Jukic M, Buhinicek I, Vragolovic A, Kozic Z, others. 2009.** Breeding maize for resistance to stalk anthracnose. *Maydica* **54**: 229.
- Parbery DG. 1996.** Trophism and the ecology of fungi associated with plants. *Biological Reviews* **71**: 473–527.
- Park C-H, Chen S, Shirsekar G, Zhou B, Khang CH, Songkumarn P, Afzal AJ, Ning Y, Wang R, Bellizzi M, et al. 2012.** The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *The Plant Cell* **24**: 4748–4762.
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y. 2009.** Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* **25**: 1.
- Pechanova O, Takáč T, Šamaj J, Pechan T. 2013.** Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. *Proteomics* **13**: 637–662.
- Pel MJC, Pieterse CMJ. 2013.** Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1237–1248.
- Pendleton AL, Smith KE, Feau N, Martin FM, Grigoriev IV, Hamelin R, Nelson CD, Burleigh JG, Davis JM. 2014.** Duplications and losses in gene families of rust pathogens highlight putative effectors. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Perfect SE, Green JR. 2001.** Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2**: 101–108.
- Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ, Green JR. 1999.** *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 186–198.
- Perfect SE, O'Connell RJ, Green EF, Doering-Saad C, Green JR. 1998.** Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*–bean interaction. *The Plant Journal* **15**: 273–279.
- Persoons A, Morin E, Delaruelle C, Payen T, Halkett F, Frey P, De Mita S, Duplessis S. 2014.** Patterns of genomic variation in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* identify pathogenesis-related factors. *Frontiers in Plant Science* **5**: 450.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011.** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**: 785–786.

- Petre B, Saunders DGO, Sklenar J, Lorrain C, Win J, Duplessis S, Kamoun S. 2015.** Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 689–700.
- Petutschnig EK, Jones AME, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V. 2010.** The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 28902–28911.
- Pieterse CMJ, Does DV der, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Wees SCMV. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.
- Pieterse CM, Ton J, Van Loon LC. 2001.** Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* **3**: 1–8.
- Politis DJ, Wheeler H. 1973.** Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiological Plant Pathology* **3**: 465–468.
- Postel S, Kemmerling B. 2009.** Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**: 1025–1031.
- Pretsch K, Kemen A, Kemen E, Geiger M, Mendgen K, Voegelé R. 2013.** The rust transferred proteins—a new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. *Molecular Plant Pathology* **14**: 96–107.
- Prusky D. 1996.** Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 413–434.
- Prusky D, Freeman S, Dickman MB. 2000.** *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. *United States of America: American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Quentin M, Abad P, Favery B. 2013.** Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Plant Biotic Interactions* **4**: 53.
- Raffaele S, Kamoun S. 2012.** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 417–430.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN. 2012.** Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant–fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 477–482.
- Ramírez V, López A, Mauch-Mani B, Gil MJ, Vera P. 2013.** An extracellular subtilase switch for immune priming in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog* **9**: e1003445.
- Rautengarten C, Steinhauser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T. 2005.** Inferring Hypotheses on Functional Relationships of Genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* Subtilase Gene Family. *PLoS Computational Biology* **1**: e40.
- Rawlings ND, Barrett AJ. 1993.** Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**: 205–218.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2012.** MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* **40**: D343–D350.

- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. 2006.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **34**: D270–D272.
- Réblová M, Gams W, Seifert KA. 2011.** *Monilochaetes* and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology* **68**: 163–191.
- Rech GE, Sanz-Martín JM, Anisimova M, Sukno SA, Thon MR. 2014.** Natural selection on coding and noncoding DNA sequences is associated with virulence genes in a plant pathogenic fungus. *Genome Biology and Evolution* **6**: 2368–2379.
- Redkar A, Hoser R, Schilling L, Zechmann B, Krzymowska M, Walbot V, Doehlemann G. 2015.** A secreted effector protein of *Ustilago maydis* guides maize leaf cells to form tumors. *The Plant Cell* **27**: 1332–1351.
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PRJ, Beynon JL. 2005.** Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by *RPP1* resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *The Plant Cell* **17**: 1839–1850.
- Remigi P, Anisimova M, Guidot A, Genin S, Peeters N. 2011.** Functional diversification of the *GALA* type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytologist* **192**: 976–987.
- Ren Y, Wee KE, Chang FN. 2000.** Deficiency of current methods in assaying endochitinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**: 302–305.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000.** Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 707–719.
- Ribot C, Césari S, Abidi I, Chalvon V, Bournaud C, Vallet J, Lebrun M-H, Morel J-B, Kroj T. 2013.** The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *The Plant Journal* **74**: 1–12.
- Rivas S, Genin S. 2011.** A plethora of virulence strategies hidden behind nuclear targeting of microbial effectors. *Frontiers in Plant Science* **2**.
- Römer P, Recht S, Strauß T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S, Lahaye T. 2010.** Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific *TAL* effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **187**: 1048–1057.
- Ron M, Avni A. 2004.** The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell* **16**: 1604–1615.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Rooney HCE. 2005.** *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**: 1783–1786.
- Ross AF. 1961.** Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340–358.

- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, Vries S de, Zipfel C. 2011.** The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* **23**: 2440–2455.
- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BP. 2014.** Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 96–103.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. 1996.** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809–1819.
- Saitoh H, Fujisawa S, Ito A, Mitsuoka C, Berberich T, Tosa Y, Asakura M, Takano Y, Terauchi R. 2009.** *SPM1* encoding a vacuole-localized protease is required for infection-related autophagy of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* **300**: 115–121.
- Saitoh H, Fujisawa S, Mitsuoka C, Ito A, Hirabuchi A, Ikeda K, Irieda H, Yoshino K, Yoshida K, Matsumura H, et al. 2012.** Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathogens* **8**: e1002711.
- Sambrook J, Russell DW. 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. CSHL Press.
- Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault J-H, Clément C, Baillieux F, Dorey S. 2012.** Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiology* **160**: 1630–1641.
- Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. 2012.** Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta* **235**: 965–978.
- Sánchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg D-J, Thomma BP, Mesters JR. 2013.** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* **2**: e00790.
- Sanz-Martín JM, Pacheco-Arjona JR, Bello-Rico V, Vargas WA, Monod M, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2016a.** A highly conserved metalloprotease effector enhances virulence in the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular plant pathology* **17**: 1048–1062.
- Sanz-Martín JM, Postigo V, Mateos A, Albrecht B, Munkvold GP, Thon MR, Sukno SA. 2016b.** First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose stalk rot in the Alentejo region, Portugal. *Plant Disease* **100**: 648.
- Savchenko T, Walley JW, Chehab EW, Xiao Y, Kaspi R, Pye MF, Mohamed ME, Lazarus CM, Bostock RM, Dehesh K. 2010.** Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *The Plant Cell* **22**: 3193–3205.
- Schaller A, Stintzi A, Graff L. 2012.** Subtilases – versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum* **145**: 52–66.
- Scheler C, Durner J, Astier J. 2013.** Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 534–539.

- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000.** Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11655–11660.
- Schilling L, Matei A, Redkar A, Walbot V, Doehlemann G. 2014.** Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Molecular Plant Pathology* **15**: 780–789.
- Schirawski J, Mannhaupt G, Munch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, Di Stasio M, Rossel N, Mendoza-Mendoza A, Pester D, *et al.* 2010.** Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**: 1546–1548.
- Schliebner I, Becher R, Hempel M, Deising HB, Horbach R. 2014.** New gene models and alternative splicing in the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* revealed by RNA-Seq analysis. *BMC Genomics* **15**: 842.
- Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E. 2010.** Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 17421–17426.
- Schrödinger L. 2010.** The PyMOL molecular graphics system, Version 1.3r1.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. 2008.** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 941–950.
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L’Haridon F, Métraux J-P. 2014.** The cuticle and plant defense to pathogens. *Plant Biotic Interactions* **5**: 274.
- Shao Z-Q, Xue J-Y, Wu P, Zhang Y-M, Wu Y, Hang Y-Y, Wang B, Chen J-Q. 2016.** Large-scale analyses of angiosperm Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. *Plant Physiology* **170**: 2095–2109.
- Sharpee W, Oh Y, Yi M, Franck W, Eyre A, Okagaki L, Valent B, Dean R. 2016.** Identification and characterization of suppressors of plant cell death (SPD) genes from *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **In press**.
- Shi L, Li R, Liao S, Bai L, Lu Q, Chen B. 2014.** Prb1, a subtilisin-like protease, is required for virulence and phenotypical traits in the chestnut blight fungus. *FEMS Microbiology Letters* **359**: 26–33.
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, *et al.* 2010.** Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal* **64**: 204–214.
- Shoresh M, Harman GE. 2010.** Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo-endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC plant biology* **10**: 136.
- Siezen RJ, Leunissen JAM. 1997.** Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* **6**: 501–523.

- Siezen RJ, Renckens B, Boekhorst J. 2007.** Evolution of prokaryotic subtilases: Genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **67**: 681–694.
- Siezen RJ, de Vos WM, Leunissen JA, Dijkstra BW. 1991.** Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Engineering* **4**: 719–737.
- Sirakova TD, Markaryan A, Kolattukudy PE. 1994.** Molecular cloning and sequencing of the cDNA and gene for a novel elastinolytic metalloproteinase from *Aspergillus fumigatus* and its expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **62**: 4208–4218.
- Skibbe DS, Doehlemann G, Fernandes J, Walbot V. 2010.** Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**: 89–92.
- Skoropad WP. 1967.** Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form appressoria and penetrate barley leaves. *Canadian Journal of Plant Science* **47**: 431–434.
- Slavokhotova AA, Naumann TA, Price NPJ, Rogozhin EA, Andreev YA, Vassilevski AA, Odintsova TI. 2014.** Novel mode of action of plant defense peptides – hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases. *FEBS Journal* **281**: 4754–4764.
- Smith T.L., S.A. L. 1990.** Isolation and characterization of a *Ustilago maydis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *Gene* **93**: 111–117.
- Soanes D, Richards TA. 2014.** Horizontal gene transfer in eukaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 583–614.
- Song W, Wang B, Li X, Wei J, Chen L, Zhang D, Zhang W, Li R. 2015.** Identification of immune related LRR-containing genes in maize (*Zea mays* L.) by genome-wide sequence analysis. *International Journal of Genomics* **2015**: 1–11.
- Song J, Win J, Tian M, Schornack S, Kaschani F, Ilyas M, van der Hoorn RA, Kamoun S. 2009.** Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 1654–1659.
- Southern EM. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503–517.
- Spoel SH, Dong X. 2012.** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**: 89–100.
- Sreedhar L, Kobayashi DY, Bunting TE, Hillman BI, Belanger FC. 1999.** Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. *Gene* **235**: 121–129.
- Staben C, Jensen B, Singer M, Pollock J, Schechtman M, Kinsey J, Selker E. 1989.** Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Newsletters* **36**: 79–81.
- Stahl EA, Bishop JG. 2000.** Plant–pathogen arms races at the molecular level. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 299–304.

- St. Leger RJ, Frank DC, Roberts DW, Staples RC. 1992.** Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* **204**: 991–1001.
- Stam R, Jupe J, Howden AJM, Morris JA, Boevink PC, Hedley PE, Huitema E. 2013.** Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. *PLoS ONE* **8**: e59517.
- Stephenson S-A, Hatfield J, Rusu AG, Maclean DJ, Manners JM. 2000.** CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 929–941.
- Stergiopoulos I, Burg HA van den, Ökmen B, Beenen HG, Liere S van, Kema GHJ, Wit PJGM de. 2010.** Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 7610–7615.
- Stergiopoulos I, Cordovez V, Ökmen B, Beenen HG, Kema GHJ, de Wit PJGM. 2014.** Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* **15**: 447–460.
- Stotz HU, Mitrousis GK, de Wit PJGM, Fitt BDL. 2014.** Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **19**: 491–500.
- Strable J, Scanlon MJ. 2009.** Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**: pdb.emo132.
- Stukenbrock EH, McDonald BA. 2009.** Population genetics of fungal and oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 371–380.
- Sukno SA, García VM, Shaw BD, Thon MR. 2008a.** Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 823–832.
- Sukno SA, Garcia VM, Shaw BD, Thon MR. 2008b.** Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 823–832.
- Sukno SA, Sanz-Martín JM, González-Fuente M, Hiltbrunner J, Thon MR. 2014.** First report of anthracnose stalk rot of maize caused by *Colletotrichum graminicola* in Switzerland. *Plant Disease* **98**: 694–694.
- Takahara H, Dolf A, Endl E, O’Connell R. 2009.** Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from *Arabidopsis* leaves for stage-specific transcriptome analysis. *The Plant Journal* **59**: 672–683.
- Takken FL, Albrecht M, Tameling WI. 2006.** Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 383–390.
- Tanaka S, Brefort T, Neidig N, Djamei A, Kahnt J, Vermerris W, Koenig S, Feussner K, Feussner I, Kahmann R. 2014.** A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife* **3**: e01355.

- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**: 317–330.
- Teixeira PJPL, Thomazella DP de T, Reis O, Prado PFV do, Rio MCS do, Fiorin GL, José J, Costa GGL, Negri VA, Mondego JMC, et al. 2014. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell* **26**: 4245–4269.
- Terauchi R, Yoshida K. 2010. Towards population genomics of effector–effector target interactions. *New Phytologist* **187**: 929–939.
- Thomas JO, Travers AA. 2001. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 167–174.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4–15.
- Thomma BP, Penninckx IA, Cammue BP, Broekaert WF. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**: 63–68.
- Thon MR, Nuckles EM, Takach JE, Vaillancourt LJ. 2002. *CPR1*: a gene encoding a putative signal peptidase that functions in pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* to maize. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 120–128.
- Thon MR, Nuckles EM, Vaillancourt LJ. 2000. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1356–1365.
- Tian M, Benedetti B, Kamoun S. 2005. A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiology* **138**: 1785–1793.
- Tian M, Huitema E, Cunha L da, Torto-Alalibo T, Kamoun S. 2004. A kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 26370–26377.
- Tian M, Win J, Song J, Hoorn R van der, Knaap E van der, Kamoun S. 2007. A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiology* **143**: 364–377.
- Tornero P, Conejero V, Vera P. 1996a. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 6332–6337.
- Tornero P, Mayda E, Gómez MD, Cañas L, Conejero V, Vera P. 1996b. Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *The Plant Journal* **10**: 315–330.
- Torres MF, Ghaffari N, Buiate EAS, Moore N, Schwartz S, Johnson CD, Vaillancourt LJ. 2016. A *Colletotrichum graminicola* mutant deficient in the establishment of biotrophy reveals early transcriptional events in the maize anthracnose disease interaction. *BMC Genomics* **17**: 202.

- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. 2006.** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373–378.
- Trdá L, Fernandez O, Boutrot F, Héloir M-C, Kelloniemi J, Daire X, Adrian M, Clément C, Zipfel C, Dorey S, et al. 2014.** The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytologist* **201**: 1371–1384.
- Tripathi LP, Sowdhamini R. 2006.** Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* **7**: 200.
- Tucker SL, Besi MI, Galhano R, Franceschetti M, Goetz S, Lenhart S, Osbourn A, Sesma A. 2010.** Common genetic pathways regulate organ-specific infection-related development in the rice blast fungus. *The Plant Cell* **22**: 953–972.
- Ubhayasekera W, Rawat R, Ho SWT, Wiweger M, Arnold SV, Chye M-L, Mowbray SL. 2009.** The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. *Plant Molecular Biology* **71**: 277–289.
- Udaya Prakash NA, Jayanthi M, Sabarinathan R, Kanguane P, Mathew L, Sekar K. 2010.** Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *Journal of Molecular Evolution* **70**: 466–478.
- Uecker FA. 1988.** A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology, and biology. *Mycologia Memoirs* **13**: 1–231.
- Vaillancourt LJ, Hanau RM. 1991.** A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola*(*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Phytopathology* **81**: 530–534.
- Van der Biezen EA, Jones JDG. 1998.** The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* **8**: R226–R228.
- Vander P, Vårum KM, Domard A, Gueddari NEE, Moerschbacher BM. 1998.** Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology* **118**: 1353–1359.
- Vargas WA, Martín JMS, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2012.** Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. *Plant Physiology* **158**: 1342–1358.
- Vargas WA, Sanz-Martín JM, Rech GE, Armijos-Jaramillo VD, Rivera LP, Echeverría MM, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2016.** A fungal effector with host nuclear localization and DNA-binding properties is required for maize anthracnose development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**: 83–95.
- Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova NV, Taliansky M, Wolpert TJ. 2011.** A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1289–1297.
- Venard C, Vaillancourt L. 2007.** Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *C. sublineolum*. *Mycologia* **99**: 368–377.

- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP. 2014.** Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 196–206.
- Vu K, Tham R, Uhrig JP, Thompson GR, Pombejra SN, Jamklang M, Bautos JM, Gelli A. 2014.** Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *mBio* **5**: e01101-14.
- Wan J, Zhang X-C, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim S, Stacey MG, Stacey G. 2008.** A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 471–481.
- Wang G-F, Balint-Kurti PJ. 2015.** Cytoplasmic and nuclear localizations are important for the hypersensitive response conferred by maize autoactive Rp1-D21 protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 1023–1031.
- Wang B, Liu X, Wu W, Liu X, Li S. 2009.** Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Microbiological Research* **164**: 665–673.
- Warren HL. 1976.** Relationship of *Colletotrichum graminicola* to foliar and kernel infection. *Plant Disease* **60**: 1084–1086.
- Warren HL, Nicholson RL, Turner MT. 1975.** Field reaction of corn inbreds to *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease* **59**: 767–769.
- Warren HL, others. 1977.** Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. *Phytopathology* **67**: 160–162.
- Waterhouse RM, Tegenfeldt F, Li J, Zdobnov EM, Kriventseva EV. 2013.** OrthoDB: a hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs. *Nucleic Acids Research* **41**: D358–D365.
- Weihmann F, Eisermann I, Becher R, Krijger J-J, Hübner K, Deising HB, Wirsal SGR. 2016.** Correspondence between symptom development of *Colletotrichum graminicola* and fungal biomass, quantified by a newly developed qPCR assay, depends on the maize variety. *BMC Microbiology* **16**: 94.
- Werner S, Sugui JA, Steinberg G, Deising HB. 2007.** A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1555–1567.
- Werner AK, Witte C-P. 2011.** The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* **16**: 381–387.
- Wharton PS, Julian AM, O’Connell RJ. 2001.** Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* **91**: 149–158.
- Whigham E, Qi S, Mistry D, Surana P, Xu R, Fuerst G, Pliego C, Bindschedler LV, Spanu PD, Dickerson JA, et al. 2015.** Broadly conserved fungal effector BEC1019 suppresses host cell death and enhances pathogen virulence in powdery mildew of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 968–983.

- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, *et al.* 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118.
- Wijesundera RLC, Bailey JA, Byrde RJV, Fielding AH. 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34**: 403–413.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman M-A, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono J-J, Cullimore JV, *et al.* 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 19824–19829.
- Wilson LM, Howlett BJ. 2005. *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica napus*, secretes a subtilisin-like serine protease. *European Journal of Plant Pathology* **112**: 23–29.
- Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D. 2010. The type III effector HopF2Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2349–2354.
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, Kamoun S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell* **19**: 2349–2369.
- Wit PJGM de, Burgt A van der, Ökmen B, Stergiopoulos I, Abd-Elsalam KA, Aerts AL, Bahkali AH, Beenen HG, Chettri P, Cox MP, *et al.* 2012. The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLOS Genetics* **8**: e1003088.
- Wu F, Guclu H. 2013. Global maize trade and food security: Implications from a social network model. *Risk Analysis* **33**: 2168–2178.
- Wu Y, Zhou J-M. 2013. Receptor-like kinases in plant innate immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**: 1271–1286.
- Yamaguchi Y, Huffaker A. 2011. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 351–357.
- Yang F, Li W, Jørgensen HJL. 2013. Transcriptional Reprogramming of Wheat and the Hemibiotrophic Pathogen *Septoria tritici* during Two Phases of the Compatible Interaction. *PLoS ONE* **8**: e81606.
- Yi M, Valent B. 2013. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 587–611.
- Yike I. 2011. Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia* **171**: 299–323.
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, *et al.* 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **21**: 1573–1591.

- Yoshino K, Irieda H, Sugimoto F, Yoshioka H, Okuno T, Takano Y. 2012.** Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 625–636.
- Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, Seo J-A, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. 2004.** Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 973–981.
- Yu J, Lee K-M, Son M, Kim K-H. 2015.** Effects of the deletion and over-expression of *Fusarium graminearum* gene FgHal2 on host response to mycovirus *Fusarium graminearum* virus 1. *Molecular Plant Pathology* **16**: 641–652.
- Zeilinger S, Gupta VK, Dahms TES, Silva RN, Singh HB, Upadhyay RS, Gomes EV, Tsui CK-M, S CN. 2015.** Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 182–207.
- Zhang Y, Bak DD, Heid H, Geider K. 1999.** Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *Journal of Molecular Biology* **289**: 1239–1251.
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, et al. 2010.** Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host & Microbe* **7**: 290–301.
- Zhang X, Wang Y, Chi W, Shi Y, Chen S, Lin D, Jin Y. 2014.** Metalloprotease genes of *Trichophyton mentagrophytes* are important for pathogenicity. *Medical Mycology* **52**: 36–45.
- Zhao C, Johnson BJ, Kositsup B, Beers EP. 2000.** Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiology* **123**: 1185–1196.
- Zipfel C. 2009.** Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420.
- Zipfel C. 2014.** Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* **35**: 345–351.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. 2006.** Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 805–836.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a la preparación de esta tesis y me han apoyado durante estos últimos seis años.

Mi especial agradecimiento a mis dos tutores, el **Dr. Michael Thon** y la **Dra. Serenella Sukno**. Gracias a ambos por haberme ofrecido la oportunidad de realizar el doctorado en el Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca. Agradezco de veras el haberme permitido formar parte de vuestro grupo de investigación, así como vuestra ayuda y esfuerzo a la hora de enseñarme sobre diversos temas científicos. Por último, no olvidaré vuestros consejos, sugerencias y críticas constructivas a lo largo de este trabajo, especialmente sobre cómo mejorar científicamente los manuscritos. Gracias por todas estas cosas.

También me gustaría dar las gracias a la Universidad de Salamanca y al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, el cual me concedió una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) de cuatro años con la que realizar este trabajo.

I also would like to thank **Prof. Dr. Kelly Craven** who invited me to his laboratory at The Samuel Roberts Noble Foundation in Ardmore for three months and provided me with an excellent confocal/fluorescence microscope to conduct parts of this work. Prof. Craven, I really appreciate your trust and great support for me during my stay in the USA. In addition, I would like to extend my great appreciation to **Myoung-Hwan Chi, Junya Shoji** and **Prasun Ray** for their help in the laboratory and hospitality when I stayed in Ardmore. Thank you all very much for your concern and support!

Sin lugar a dudas, este trabajo nunca podría haberse llevado a cabo sin las personas que me ayudaron y apoyaron tanto de forma técnica como práctica. Agradezco especialmente al **Dr. Walter Vargas**, por ser mi mentor y guía durante mis primeros años en el laboratorio, enseñarme gran parte de lo que he aprendido y ser paciente con mis errores, pero sobre todo por convertirse en un gran amigo para mí. Walter, gracias por todo lo que hiciste. También me gustaría agradecer a mis compañeros bioinformáticos del grupo **Gabriel, Vinicio, Víctor y Ramón** por todas las buenas y divertidas conversaciones dentro y fuera del laboratorio, sobre el trabajo y muchas otras cosas. Ha sido auténtico placer trabajar con vosotros.

Gracias a nuestras técnicas de laboratorio **Verónica, Montaña** y principalmente **Elena**, ya que sin su constante ayuda el trabajo durante los últimos años se habría vuelto mucho más tedioso.

También me gustaría expresar mi más profunda gratitud a todos los miembros antiguos y actuales de los grupos de *Fusarium* y *Botrytis* por su apoyo. En especial al **Dr. José María Díaz Mínguez** y al **Dr. Ernesto Pérez Benito**, quienes me brindaron toda su amabilidad y simpatía, así como sus consejos y conocimientos científicos cuando los necesitaba. Gracias a su excelente gestión hemos podido compartir muy buenos momentos durante todos estos años. Me gustaría agradecer a todos mis compañeros de laboratorio: **Raúl, Wilson, Eduardo, Daniela, Álex, Fran, Thais, Rebeca, Carlos, Víctor, Vicky** y **Vega**. Ellos hicieron posible que el laboratorio se convirtiera en un lugar de trabajo donde disfrutar diariamente. También quisiera agradecer especialmente al **Dr. Dov Prusky**, por su sabiduría y entusiasmo científico.

Gracias a todos los estudiantes que trabajaron bajo mi supervisión y que han ayudado a contribuir a esta tesis. **Zuzanna, Manuel, Delia, Vanessa, Daniel** y **Mariotte**. Os deseo una carrera llena de éxitos!!

También me gustaría agradecer a todo el personal del CIALE, incluyendo profesores y personal de administración, así como a aquellos otros amigos y compañeros de laboratorio con los cuales he compartido momentos memorables durante mi doctorado, especialmente a **Irene, Lucía, Esther, Ángel** y **Jorge**. Y por supuesto gracias a todos aquellos entrañables integrantes que formaron parte del equipo de fútbol del CIALE, con el que jugamos pachangas y campeonatos.

Gracias a la **Dra. Rosa Morcuende** y a **Rubén Vicente** por permitirme generosamente utilizar su equipo y ayudarme con las lecturas de fluorescencia.

Gracias a **Tomás** y a todas las otras personas que trabajaron durante este tiempo en el invernadero, sin su ayuda para cuidar de las plantas no se habrían podido llevar a cabo estos experimentos.

Gracias a **Vir**, por tratarme siempre tan bien y ofrecerme su ayuda y apoyo durante todos estos años. Tu cariño y amistad han sido para mí un regalo muy valioso que

forma parte de las cosas más importantes que he conseguido durante mi tiempo de doctorado y que nunca olvidaré. Gracias también por tus consejos siempre sensatos y por esos momentos de desconexión que a veces eran tan necesarios. Te has convertido en una verdadera amiga para mí.

Gracias a **Joni**, mi compañero y hermano desde el comienzo de nuestra aventura universitaria, juntos hemos compartido en todos estos años muchísimas risas y momentos inolvidables. A ti te debo también una parte de lo que soy ahora, tanto científica como personalmente. Siempre un ejemplo de actitud positiva, con un grandísimo humor y bastante locura, hacías que trabajar diariamente en el laboratorio se convirtiera en algo divertido y ameno. Gracias de verdad por ser como eres, por tus consejos, tu apoyo incondicional y por estar siempre dispuesto a echarme una mano en todo lo que necesitaba.

Finalmente, pero no por ello menos importante, me gustaría agradecer a todos los miembros de **mi familia**, especialmente a mis queridos **padres, hermanos y abuelos** por su constante cariño y apoyo incondicional, dándome fuerzas cuando más lo necesitaba. Sin vosotros este trabajo jamás hubiera sido posible.

