



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

Sistemas hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: lipasas y poligalacturonasas

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba para optar al grado de Doctora en Biología por el licenciado:

Gustavo Adolfo Bravo Ruiz

Dirigido por

Dra. M. Isabel González Roncero

Dra. Carmen Ruiz Roldán

Córdoba, Junio 2013

TÍTULO: *Sistemas Hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici: lipasas y poligalaturonasas*

AUTOR: *Gustavo Bravo Ruiz*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Dña M. Isabel González Roncero, catedrática de Genética de la Universidad de Córdoba

Dña. Carmen Ruiz Roldán, investigadora del Programa Ramón y Cajal

Informan:

Que el trabajo titulado “**Sistemas hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: lipasas y poligalacturonasas**” realizado por D. **Gustavo Adolfo Bravo Ruiz** bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expido el presente informe

Córdoba el 14 de junio de 2013

M. Isabel González Roncero

Carmen Ruiz Roldán

Departamento de Genética

Universidad de Córdoba

Dña. M. Angeles Alonso Moraga, Directora del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba

Informa:

Que el trabajo titulado “**Sistemas hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: lipasas y poligalacturonasas**” realizado por D. **Gustavo Adolfo Bravo Ruiz** bajo la dirección de Dña M. Isabel González Roncero y Dña Carmen Ruiz Roldán, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expido el presente informe

Córdoba el 14 de junio de 2013

Dña. M. Angeles Alonso Moraga

Departamento de Genética

Universidad de Córdoba

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO2010-015505) y la Junta de Andalucía (P08-CVI-3847). G.B.R. ha sido beneficiario de una beca de la Junta de Andalucía (Spain) y ha pasado seis semanas en el laboratorio de Prof. Schäfer dentro del proyecto bilateral Acción Integrada Hispano-Germana HD2008-0072, Ministerio de Ciencia e Innovación)

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directoras de tesis, Reyes y Carmen, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo y haber depositado en mí toda su confianza y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

También me gustaría agradecer a todas las chicas y chicos del laboratorio, y a los mayores, ppor haberme prestado vuestra ayuda siempre que la he necesitado, y haberme enseñado tantas cosas. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros.

Por último, me gustaría dedicar este trabajo a toda mi familia, por su ánimo, apoyo, comprensión y confianza

INDICES

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. Interacción planta patógeno	6
1.1. Reconocimiento del hospedador y del patógeno	6
1.2. Penetración en la planta	7
1.3. Colonización	8
2. El género <i>Fusarium</i>	9
2.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	10
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	21
1. Materiales	22
1.1. Material biológico.....	22
1.2. Medios.....	23
1.3 Compuestos químicos y kits	24
1.4 Oligonucleótidos sintéticos	28
1.5 Vectores de clonación	33
1.6 Programas informáticos y páginas webs	33
1.7 Aparatos utilizados	35
2. Crecimiento y mantenimiento de organismos biológicos.....	36
2.1 Bacterias	36
2.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	37
2.3 Plantas	37
3. Aislamiento de ácidos nucleicos	37
3.1 Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> con CTAB.....	37
3.2 Extracción de ADN de <i>F. oxysporum</i>	38
3.3 Extracción de ARN de <i>F. oxysporum</i>	40
3.4 Extracción de ARN de plantas infectadas.....	40

4. Manipulación de ácidos nucleicos	41
4.1 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	41
4.2 Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	41
4.3 Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos	42
4.4 Cuantificación de ácidos nucleicos	42
4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
4.6 Precipitación de ADN	47
4.7 Hibridación y detección de ácidos nucleicos.....	47
4.8 Secuenciación de ADN.....	50
5. Transformación genética.....	51
5.1 Transformación de <i>E. coli</i>	51
5.2 Transformación de <i>F. oxysporum</i>	52
6. Ensayos de infección de plantas de tomate	56
7. Manipulación de muestras proteicas	58
7.1 Determinación de la cantidad total de proteínas	58
7.2 Isoelectroenfoque preparativo	58
7.3 Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	58
7.4 Tinción con azul de Coomassie.....	59
7.5 Precipitación de proteínas con metanol-cloromorfo	60
7.6 Obtención de extractos proteicos	60
8. Ensayos bioquímicos de actividad lipasa	61
9. Detección de la producción de Bikaverina.....	61
9.1 Determinación de absorbancia	61
9.2 Identificación mediante espectrometría y cromatografía de masas.....	62
10. Análisis informáticos	62
10.1 Búsqueda BLAST	62
10.2 Alineamientos.....	63
10.3 Árboles filogenéticos	63
10.4 Cálculos teóricos sobre proteínas deducidas.....	63
CAPÍTULO 1	65

1. Introducción	66
1.1. Lipasas	66
1.2. Regulación transcripcional de lipasas	72
1.3. Bikaverina	76
1.4. En este estudio	77
2. Resultados	77
2.1. Identificación <i>in silico</i> y caracterización del sistema lipolítico de <i>F. oxysporum</i>	77
2.2. Caracterización bioquímica de lipasas extracelulares	88
2.3. Obtención de estirpes mutantes	91
2.4. Caracterización de estirpes mutantes de <i>F. oxysporum</i> obtenidas en este trabajo	103
3. Discusión	109
3.1. <i>F. oxysporum</i> contiene un sistema lipolítico versátil y diverso	110
3.2. Los promotores de genes lipasas son reconocidos por los factores transcripcionales Ctf1 y Ctf2	113
3.3. El sistema lipolítico de <i>F. oxysporum</i> en la utilización de ácidos grasos y en patogénesis	113
CAPITULO 2	119
1. Introducción	120
1.1 Estructura de la pectina	120
1.2 PGs de hongos	121
1.3 Aplicaciones y funciones de PGs	125
2. Resultados	128
2.1. Identificación y caracterización <i>in silico</i> de PGs	128
2.2. Patrón de expresión de los genes PGs	135
2.3. Obtención de estirpes mutantes	136
3. Discusión	138
3.1. <i>F. oxysporum</i> presenta una familia génica de PGs	138
3.2. La mayoría de las PGs estudiadas se inducen en pectina, se inhiben en glucosa y se expresan durante infección de plantas	140
3.3. Obtención de mutantes de <i>pg1</i> y <i>pgx6</i>	141

CONCLUSIONES	144
BIBLIOGRAFÍA	147

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esporas de <i>Fusarium</i>	11
Figura 2: Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i>	12
Figura 3: Penetración en raíz de <i>F. oxysporum</i>	13
Figura 4: Mecanismos de infección de <i>F oxysporum</i>	14
Figura 5: Esquema de interrupción génica mediante Split-Market.....	55
Figura 6: Índices de enfermedad durante la infección de plantas de tomate.....	57
Figura 7: Estructura de lipasa pancreática humana.....	66
Figura 8: Hidrólisis de triacilglicéridos por lipasas.....	67
Figura 9: Esquema de la estructura de α/β -hidrolasa.....	68
Figura 10: Esquema de proteínas con dedos de zinc.....	74
Figura 11: Modelo de unión al ADN de proteínas $Zn(II)_2Cys_6$	75
Figura 12: Esquema de la biosíntesis bikaverina.....	76
Figura 13: Alineamiento de lipasas.....	82
Figura 14: Árbol filogenético de lipasas.....	83
Figura 15: Análisis filogenéticos de Ctf1 y Ctf2.....	84
Figura 16: Perfil lipídico extracelular de <i>F. oxysporum</i>	89
Figura 17: Expresión de genes lipasas <i>in planta</i>	90
Figura 18: Interrupción génica de <i>lip1</i>	91
Figura 19: Interrupción génica de <i>lip2</i>	93
Figura 20: Interrupción génica de <i>lip3</i>	94
Figura 21: Interrupción génica de <i>lip5</i>	95
Figura 22: Interrupción génica de <i>lip22</i>	96

Figura 23: Interrupción génica de <i>ctf1</i>	98
Figura 24: Interrupción génica de <i>ctf2</i>	99
Figura 25: Obtención del doble mutante $\Delta ctf1\Delta ctf2$	100
Figura 26: Obtención de complementado $\Delta ctf1::ctf1$	101
Figura 27: Obtención de complementado $\Delta ctf2::ctf2$	102
Figura 28: Infección con mutantes Ctf.....	104
Figura 29: Actividad de mutantes lipasas.....	105
Figura 30: Producción de bikaverina por mutantes lipasas.....	107
Figura 31: Crecimiento en ácidos grasos de mutantes Ctf.....	108
Figura 32: Expresión de genes lipasas en mutantes Ctf.....	110
Figura 33: Esquema de la estructura de la pared celular.....	120
Figura 34: Esquema de la estructura de la pectina.....	122
Figura 35: Esquema de endo- y exoPG.....	123
Figura 36: Alineamiento de PGs de <i>F. oxysporum</i>	131
Figura 37: Árbol filogenético de PGs fúngicas.....	134
Figura 38: Expresión de genes PGs <i>in planta</i>	137

INDICE TABLAS

Tabla 1: Genes de <i>F. oxysporum</i> implicados en patogénesis.....	15
Tabla 2: Material biológico.....	22
Tabla 3: Compuestos químicos.....	25
Tabla 4: Oligonucleótidos usados.....	28
Tabla 5: Vectores de clonación.....	33
Tabla 6: Programas informáticos y páginas web.....	34
Tabla 7: Aparatos utilizados.....	35
Tabla 8: Condiciones de PCR estándar.....	43
Tabla 9: Condiciones de PCR cuantitativa.....	45
Tabla 10: Condiciones de PCR de fusión.....	46
Tabla 11: Modificaciones manuales de genes lipasas.....	78
Tabla 12: Características de genes lipasas.....	79
Tabla 13: Identidades de lipasas del genero <i>Fusarium</i>	81
Tabla 14: Motivos de reconocimiento de Ctf en promotores de genes lipasa.....	85
Tabla 15: Motivos de regulación por ácidos grasos en promotores de genes lipasa.....	87
Tabla 16: Modificaciones manuales de genes PGs.....	129
Tabla 17: Características de genes PGs.....	130
Tabla 18: Identidades de PGs del genero <i>Fusarium</i>	132
Tabla 19: Motivos de regulación en promotores de genes PGs.....	135
Tabla 20: Expresión de genes PGs <i>in vitro</i>	136

RESUMEN

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* es un hongo patógeno que infecta plantas de tomate a través de su raíz. En este trabajo se ha investigado las bases moleculares que determinan la patogenicidad de este hongo sobre plantas de tomate, estudiando la importancia de enzimas hidrolíticas, particularmente lipasas y poligalacturonasas, debido a su particular capacidad para degradar la cutina y la pectina, presentes en la pared celular de plantas.

El perfil lipolítico de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* ha sido analizado mediante estudios *in silico* y ensayos bioquímicos de actividad. Se han identificado venticinco lipasas estructurales que presentan el pentapéptido -Gly-X-Ser-X-Gly-, característico de lipasas fúngicas, y la secuencia señal de secreción. Además, se han identificado dos reguladores de lipasas, *ctf1* y *ctf2*. El perfil transcripcional de trece genes lipasas durante la colonización de plantas de tomate ha revelado que *lip1*, *lip3* y *lip22* están altamente inducidas entre las 21-96 horas post-infección. Para estudiar su participación en patogénesis, se ha llevado a cabo la interrupción génica de cinco genes lipasas (*lip1*, *lip2*, *lip3*, *lip5* y *lip22*) y dos genes reguladores (*ctf1* y *ctf2*), así como un doble mutante $\Delta ctf1\Delta ctf2$. Los análisis de expresión llevados a cabo por qRT-PCR de las lipasas estructurales en los mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ ha revelado la existencia de una regulación compleja de las lipasas de *F. oxysporum*. La reducción de la actividad lipasa total, así como la reducción de la virulencia en los mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$, y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ son una evidencia del papel relevante que juega el sistema lipolítico en la virulencia de este hongo.

El estudio *in silico* de las poligalacturonasas presentes en *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* ha tenido como resultado la identificación de seis endo-poligalacturonasas y cuatro exo-poligalacturonasas, que presentan los dominios conservados característicos de poligalacturonasas fúngicas. Los análisis de expresión llevados a cabo mediante qRT-PCR han revelado que tan solo dos endo-poligalacturonasas (*pg1* y *pg5*) y dos exo-poligalacturonasas (*pgx4* y *pgx6*) se expresan a nivel significativo en presencia de pectina y durante la colonización de plantas de tomate, mostrando su implicación durante el proceso de infección. El intento de interrupción génica de los dos genes poligalacturonasas principales (*pg1* y *pgx6*), no ha resultado exitoso hasta el momento.

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* is a fungal pathogen that infects tomato plants through their roots. In this work we have investigated the molecular basis determining the pathogenicity of this fungus on tomato plants, by considering the importance of hydrolytic enzymes, particularly lipases and polygalacturonases, due to its unique ability to degrade cutin and pectin both important polymer constituents of the plant cell wall.

The lipolytic profile of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* has been studied by *in silico* search and biochemical enzyme activity analyses. Twentyfive structural secreted lipases were predicted based on the conserved pentapeptide -Gly-X-Ser-X-Gly-, characteristic of fungal lipases, and secretion signal sequences. Moreover, a predicted lipase regulatory gene has been identified in addition to the previously characterized *ctf1*. The transcription profile of thirteen lipase genes during tomato plant colonization has revealed that *lip1*, *lip3*, and *lip22* are highly induced between 21 and 96 h after inoculation. Deletion mutants in five lipase genes (*lip1*, *lip2*, *lip3*, *lip5* and *lip22*) and in the regulatory genes *ctf1* and *ctf2*, as well as a $\Delta ctf1\Delta ctf2$ double mutant, have been generated. qRT-PCR expression analyses of structural lipase genes in the $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ and $\Delta ctf1\Delta ctf2$ mutants has indicated the existence of a complex lipase regulation network in *F. oxysporum*. The reduction of total lipase activity, as well as the severely reduced virulence of the $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$, and $\Delta ctf1\Delta ctf2$ mutants provides evidence for an important role of the lipolytic system of this fungus in pathogenicity.

In silico study polygalacturonases present in *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* has resulted in the identification of six endo-polygalacturonase and four exo-polygalacturonase, presenting conserved domains characteristic of fungal polygalacturonases. Expression analysis performed by qRT-PCR has revealed that only two endo-polygalacturonase (*pg1* and *pg5*) and two exo-polygalacturonase (*pgx4* and *pgx6*) were expressed at significant levels and in the presence of pectin during tomato plant colonization, showing their involvement during the infection process. Gene disruption attempts on the two main polygalacturonase genes (*pg1* and *pgx6*) have not yet resulted successful.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Interacción planta patógeno

Las interacciones entre plantas y patógenos han tenido gran impacto en la historia de las civilizaciones, debido a las graves pérdidas causadas por enfermedades en plantas cultivadas, sobre todo por hongos. Actualmente, los patógenos causan daños al 15 % de la cosecha total. La lucha contra estos patógenos depende del empleo de pesticidas, lo que implica problemas de contaminación y la aparición de cepas resistentes, o del uso de cultivares resistentes cuyo coste es elevado. El conocimiento molecular de las interacciones planta-patógeno es fundamental para entender los mecanismos que regulan la infección y poder aplicar dicho conocimiento para la protección de los cultivos, evitando el uso de agentes químicos.

Las interacciones son procesos complejos, con estadios en los que intervienen mecanismos de reconocimiento a distintos niveles. La combinación de todos ellos determina el éxito o el fracaso de la infección (Callow, 1987). Los hongos son uno de los principales patógenos de plantas y, a pesar de poder subsistir de forma saprófita, en general desarrollan su ciclo de vida en el interior de la planta parasitada. Este hecho hace que sean considerados como organismos necrotrofos, ya que obtienen los nutrientes de la planta sin necesidad de mantenerlas vivas para completar su ciclo (Agrios, 1997).

Los mecanismos de defensa de las plantas abarcan desde la protección no específica y pasiva que confieren las barreras preformadas como la cutícula y la pared celular, hasta respuestas activas y altamente específicas propias del hospedador o de un cultivo determinado (Jackson & Taylor, 1996). Los patógenos, por su parte, han desarrollado estrategias para penetrar en la planta, invadir sus tejidos, crecer y propagarse en su interior. En los años 50, se propuso la hipótesis denominada "gen por gen" (Flor, 1947; Flor, 1971) según la cual para cada gen de avirulencia (*avr*) del patógeno existe en la planta el correspondiente gen de resistencia (*R*). La pérdida o mutación de un gen *avr* conllevaría la desaparición de la resistencia mediada por el gen *R* correspondiente.

1.1. Reconocimiento del hospedador y del patógeno

Los patógenos detectan la proximidad de la planta y ponen en marcha su maquinaria de ataque y de adaptación al interior de la misma. Por su parte, la planta reconoce la presencia del patógeno y desarrolla la respuesta de defensa para detener la invasión. Es bien conocido que los patógenos detectan la presencia del hospedador antes de establecer contacto físico. Por tanto,

disponen de mecanismos de señalización para detectar compuestos de la planta y responder activando genes para el ataque.

El primer paso para la defensa activa es reconocer al patógeno mediante receptores de membrana que reconocen moléculas producidas durante la interacción, conocidas como elicitores, ya sean de la propia planta (endógenos) o del patógeno (exógenos). Dichos elicitores inducen cambios estructurales y/o respuestas bioquímicas asociadas con la resistencia a la enfermedad. Las estructuras superficiales, como la cutícula o la pared celular están involucradas en la percepción de señales del exterior de la planta, al ser las primeras estructuras que entran en contacto con el patógeno. En general, los dominios extracelulares de los receptores de elicitores son diversos, pero los dominios citoplasmáticos están muy conservados, y por ello la respuesta ante diferentes patógenos es parecida (Benhamou, 1996; Hammond-Kosack & Jones, 1996).

1.2. Penetración en la planta

Tras entrar en contacto con la planta, el hongo penetra en ella. Para ello, tiene que atravesar las estructuras superficiales de las células, como la pared celular y la cutícula, que constituyen una barrera física, impermeable y rígida (Di Pietro et al, 2009).

Los patógenos que penetran por zonas aéreas se encuentran con la cutícula compuesta por cutina, un poliéster de ácidos grasos, impregnado en mayor o menor medida por ceras, que debe ser superada mediante proteínas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los ácidos grasos, o mediante la formación de estructuras de infección especializados o apresorios, que proporcionan la presión necesaria para atravesar la superficie exterior (Agris, 1997). Además, los lípidos cuticulares o los productos de su degradación actúan como mensajeros en el patógeno y en el hospedador, incluso induciendo la germinación y/o la formación del apresorio (Kolattukudy et al, 1995). Por el contrario, en patógenos del suelo la primera barrera física es la pared celular formada por una capa de celulosa, otra de pectina y otra de hemicelulosas, como el xilano o el glucano, además de proteínas estructurales y funcionales (Carpita & Gibeau, 1993), la cual sufre cambios químicos y estructurales para evitar la penetración del patógeno. En estos casos es frecuente que la penetración a través de la raíz dependa de enzimas hidrolíticas. Las enzimas extracelulares, sintetizadas por patógenos, que degradan las capas externas del hospedador son conocidas como CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes). Los patógenos poseen

un nivel basal de estas enzimas que generan los monómeros correspondientes. Éstos monómeros se unen a receptores específicos del hongo y desencadenan la activación de factores de transcripción que inducen la expresión de los correspondientes genes estructurales. Las CWDEs capacitan al patógeno para invadir los tejidos de las plantas, pero por otro lado pueden activar sus defensas (Di Pietro et al, 2009; Walton, 1994).

1.3. Colonización

Tras la penetración, los hongos colonizan la planta a través de los espacios intercelulares, pasando de una célula a otra. En este punto la planta ha activado sus mecanismos de defensa. Una respuesta física consiste en generar barreras para restringir el avance del patógeno. Este tipo de defensa se basa en el engrosamiento de la pared celular por calosa y lignina, reforzando los posibles sitios de penetración y/o en lugares donde se encuentra el hongo (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Otro mecanismo es la producción de compuestos químicos como toxinas o especies reactivas de oxígeno (EROs) (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Lamb & Dixon, 1997). Las toxinas se sintetizan como consecuencia del metabolismo de la planta, o bien a través de reacciones dirigidas a su producción (Bednarek & Osbourn, 2009; Morrissey & Osbourn, 1999; Osbourn, 1996). Estas se clasifican en fitoanticipinas, si se producen de forma constitutiva, como la α -tomatina del tomate (Roddick, 1977) o como fitoalexinas, que se inducen en mayor cantidad cuando hay infección, como la pisatina del guisante o la phaseolina de las judías (Matthews & Van Etten, 1983).

Las plantas también pueden sintetizar y acumular proteínas relacionadas con las patogénesis, denominadas proteínas PR. Estas proteínas son inducidas sistémicamente, y su función está relacionada con la inhibición del crecimiento del patógeno, su multiplicación y su expansión en el interior de la planta (Van Loon, 1999).

Otra respuesta consiste en la muerte rápida de las células que rodean al sitio de infección, conocida como hipersensibilidad. Las células de la planta mueren, se produce una acumulación local de fitoalexinas y se refuerza la pared celular por la deposición de calosa, lignina y suberina, dificultando así el avance del hongo (Lamb & Dixon, 1997).

El patógeno contrarresta la defensa de la planta secretando compuestos análogos a hormonas vegetales que alteran la fisiología de la planta en beneficio del patógeno, como las fitotoxinas. Ello provoca la liberación de nutrientes y la supresión de la defensa (Agrios, 1997). Muchos patógenos producen enzimas que detoxifican las toxinas vegetales. Algunas de estas moléculas son responsables del establecimiento de la enfermedad, y su carencia causa la ausencia de síntomas (Jackson & Taylor, 1996). Por ello, las moléculas necesarias para la infección se denominan factores de patogenicidad y aquellas que contribuyen a la capacidad de infectar y provocar los síntomas de la enfermedad se denominan factores de virulencia.

Después de una primera infección, la planta puede reaccionar rápidamente ante la llegada del mismo u otro patógeno relacionado (Dixon & Lamb, 1990). La respuesta frente a la primera y segunda infección es la misma, pero la segunda es más rápida ya que las células están preparadas para detener la infección. Esto se debe a que las moléculas de señalización que se generan tras la primera infección se acumulan durante varios días y difunden por toda la planta, llegando a zonas alejadas del sitio de infección. Este proceso se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) o inmunidad de las plantas.

2. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de ascomicetos que pertenecen a la clase Sordariomycetes, orden Hipocreales, familia Nectriaceae. Se encuentra ampliamente distribuido, e incluye numerosas especies, la mayoría patógenos vegetales capaces de causar marchitez vascular en numerosos de cultivos y de producir toxinas letales para especies animales (Moss & Smith, 1984). También incluye especies no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluido humanos inmunodeprimidos (Ortoneda et al, 2004; Vartivarian et al, 1993). Algunas especies son capaces de completar el ciclo sexual, aunque la mayoría presenta reproducción asexual.

Debido a las pérdidas económicas originadas por la infección con este género, y a la facilidad para su cultivo y manejo en el laboratorio, existe gran interés en el estudio de sus mecanismos de infección. Recientemente se han desarrollado herramientas genómicas que facilitan la investigación en estas especies, entre las que destacan la secuenciación y anotación del genoma de *Fusarium graminearum* (Cuomo et al, 2007), *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ma et al, 2010) aislado 4287 por el Broad Institute

(<https://www.broad.mit.edu/annotation>). Por otra parte, algunas especies del género tienen valor biotecnológico y se utilizan en control biológico y comercial, por la producción de ciclosporina y giberelinas (Desjardins et al, 1993), y en la obtención de biomasa fúngica para la elaboración de alimentos (Wiebe, 2002).

2.1 Fusarium oxysporum

F. oxysporum se describe como un patógeno de plantas, con hifas hialinas y septadas, y sin ciclo sexual conocido (estado telomórfico o peritecial), capaz de parasitar más de 120 cultivos diferentes, además de infectar a personas inmunodeprimidas (Di Pietro et al, 2003). *F. oxysporum* es un patógeno del suelo, que se ha convertido en excelente modelo de experimentación para conocer el proceso de infección de estos patógenos, y de su mecanismo de virulencia en mamíferos inmunodeprimidos. Así, *F. oxysporum* ha sido propuesto como el primer modelo de patógeno multihospedador en hongos (Ortoneda et al, 2004).

En 1940, Snyder y Hansen incluyeron a todas las especies de *Fusarium*, sección *Elegans*, en un único complejo denominado *F. oxysporum*. Cada aislado de *F. oxysporum* produce marchitez vascular en una especie vegetal determinada y, de acuerdo con la especificidad del huésped, se han clasificado en diferentes *forma specialis* (Armstrong & Armstrong, 1981). Como ejemplo, la *forma specialis lycopersici*, objeto de estudio en este trabajo, es patógena para plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Las relaciones filogenéticas entre aislados ha demostrado que la capacidad para infectar una especie vegetal ha surgido independientemente varias veces a lo largo de su evolución (Baayen et al, 2000; O'Donnell et al, 1998). La variación genética observada en una especie con reproducción asexual se atribuye a mecanismos alternativos como transposones (Daboussi & Capy, 2003) o a la formación de heterocariontes (Teunissen et al, 2002).

2.1.1. Biología

F. oxysporum forma un micelio de textura algodonosa y color blanco que puede variar de color, desde rosa pálido hasta púrpura oscuro, según el aislado y las condiciones ambientales, y también afectar a la velocidad de crecimiento, a la forma, tamaño y abundancia de sus esporas, y al número de septos de sus hifas (Booth, 1971). Las esporas de *F. oxysporum* pueden ser de

tres tipos (Figura 1). Las macroconidias representan las esporas típicas del género, aunque son las menos abundantes. Están constituidas por un número de células que oscilan de tres a cinco, son septadas, puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las microconidias, con una o dos células, son las más abundantes y presentan formas ovaladas y cilíndricas. Las clamidosporas, también con una o dos células, presentan una forma esférica y tienen una pared engrosada siendo las más resistentes (Agrios, 1997).

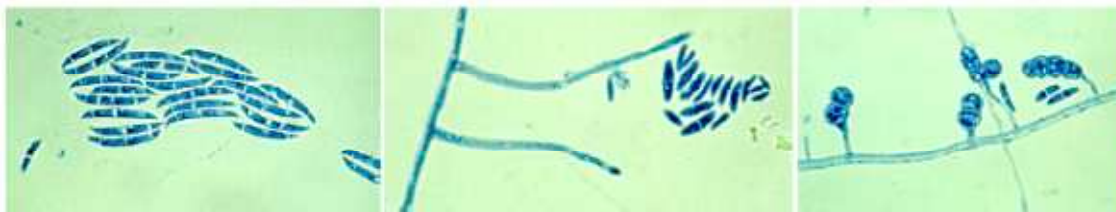


Figura 1. Esporas de *Fusarium*. **A**, Macroconidias. **B** Microconidias. **C** Clamidosporas.

F. oxysporum se propaga en distancias cortas principalmente por irrigación con agua o por equipos contaminados, y puede distribuirse a largas distancias en forma de esporas transportadas por el viento (Agrios, 1997) y se encuentra prácticamente en todos los ecosistemas terrestres.

2.1.2. Ciclo de vida

F. oxysporum es un patógeno del suelo, donde puede permanecer largos períodos de tiempo en ausencia de la planta hospedadora, principalmente como clamidospora o creciendo en restos de materia orgánica o exudados de raíces (estado saprofitico) (Beckman, 1987) (Figura 2). Cuando percibe la proximidad de la planta, se induce la germinación de las esporas y la penetración de aquellas (estado parasítico). Además puede vivir en la parte externa de raíces de plantas no hospedadoras. Una vez en el interior de una planta hospedadora, crece hasta alcanzar los vasos del xilema, colonizando las partes más altas y provocando la enfermedad (estado patogénico).

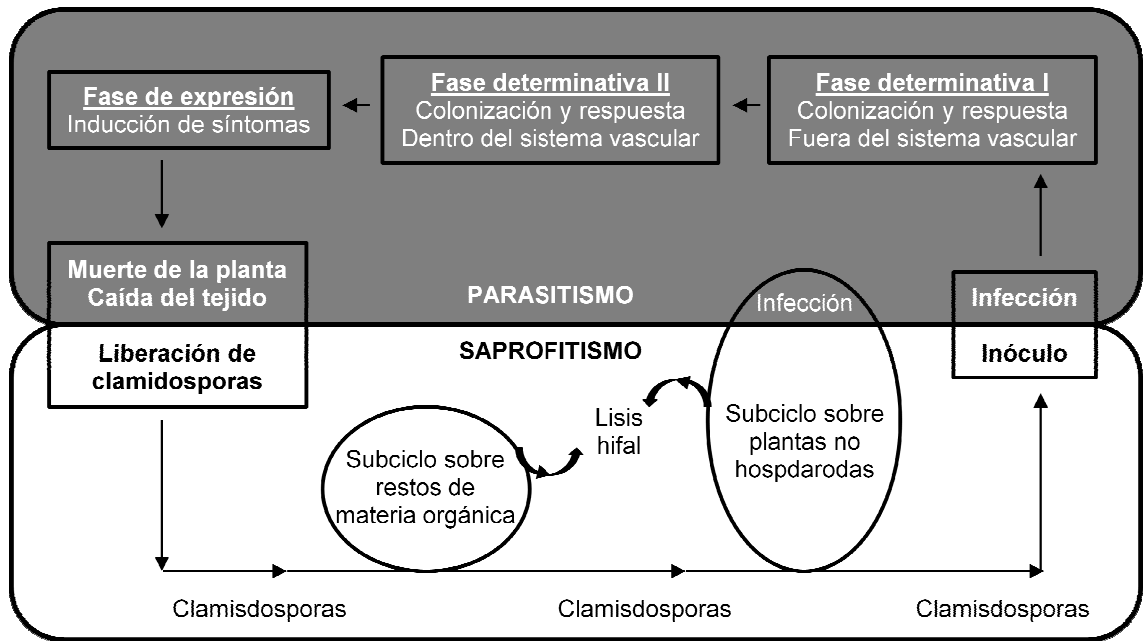


Figura 2. Ciclo de vida de *F. oxysporum* (Beckman, 1987).

2.1.3. El proceso de infección

F. oxysporum reconoce las raíces de la planta mediante diferentes mecanismos de señalización que perciben la presencia del exudado de las mismas. Se conocen dos rutas de transducción que activan estas señales y regulan el desarrollo y la virulencia del hongo: la cascada de la adenosina monofosfato - proteína quinasa A (AMPc-PKA) y la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Di Pietro et al, 2001).

Tras la adhesión de las esporas a la superficie de la raíz, se forma una densa red de hifas, visible a las pocas horas que parece necesaria para iniciar la penetración (Figura 3) (Czymmek et al, 2007; Olivain & Alabouvette, 1999; Rodríguez-Gálvez & Mendgen, 1995). La microscopía electrónica ha mostrado la inexistencia de apresorios o hifas especiales de penetración (Figura 3) (Olivain & Alabouvette, 1999) y la formación de hifas que penetran la pared de las células epidérmicas tras el estrechamiento y la formación de un septo en el punto de penetración (Pareja-Jaime et al, 2010; Perez-Nadales & Di Pietro, 2011). La penetración de la raíz conduce a una pérdida de turgor de las células vegetales y a una retracción de las mismas a medida que el hongo avanza hacia el córtex (Figura 4).

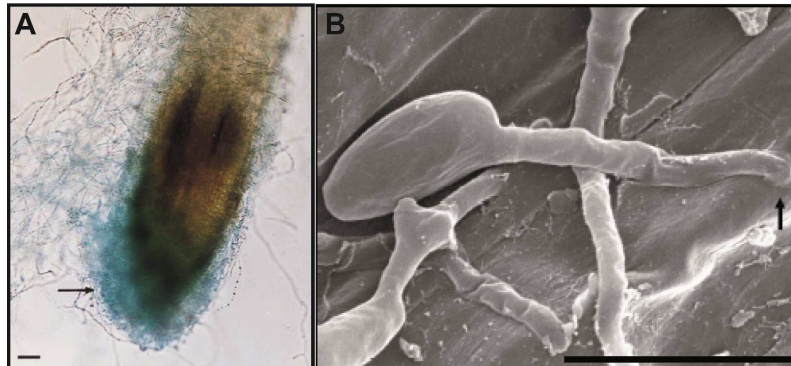


Figura 3. **A** Hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizando la raíz (flecha), tras 48 horas de la inoculación. Barra, 40 μ m (Olivain & Alabouvette, 1999). **B** Detalle de la adhesión y penetración de una espora de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en células de raíz. Barra, 8 μ m (Pareja-Jaime et al, 2010).

Por su parte, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil del interior de la planta, poniendo en marcha su maquinaria de ataque mediante la producción de CWDEs (Di Pietro et al, 2009), la producción de enzimas que degradan los compuestos tóxicos de las plantas como tomatinasas o lacasas (Canero & Roncero, 2008; Pareja-Jaime et al, 2008) y el refuerzo de su pared celular para resistir los daños causados por estas sustancias tóxicas. Tras superar estas defensas, el hongo invade el córtex creciendo por los espacios inter e intracelulares hasta llegar al sistema vascular, donde asciende hacia las partes aéreas. Dentro del xilema, *Fusarium* se ramifica y produce esporas que son transportadas por la savia a otras partes de la planta, donde germinan y de nuevo esporulan.

La proliferación del micelio y el desarrollo de estructuras de defensa en la planta para detener al patógeno provocan la obstrucción de los vasos conductores originando un desequilibrio hídrico a raíz tras el cual las hojas cierran sus estomas, comienzan a amarillear y finalmente se marchitan, junto con el tallo y el resto de la planta. En ese momento, el hongo coloniza la planta moribunda y crece vigorosamente como saprófito, produciendo gran cantidad de biomasa fúngica y clamidosporas, que caerán al suelo hasta la aparición de un nuevo hospedador (Beckman, 1987).

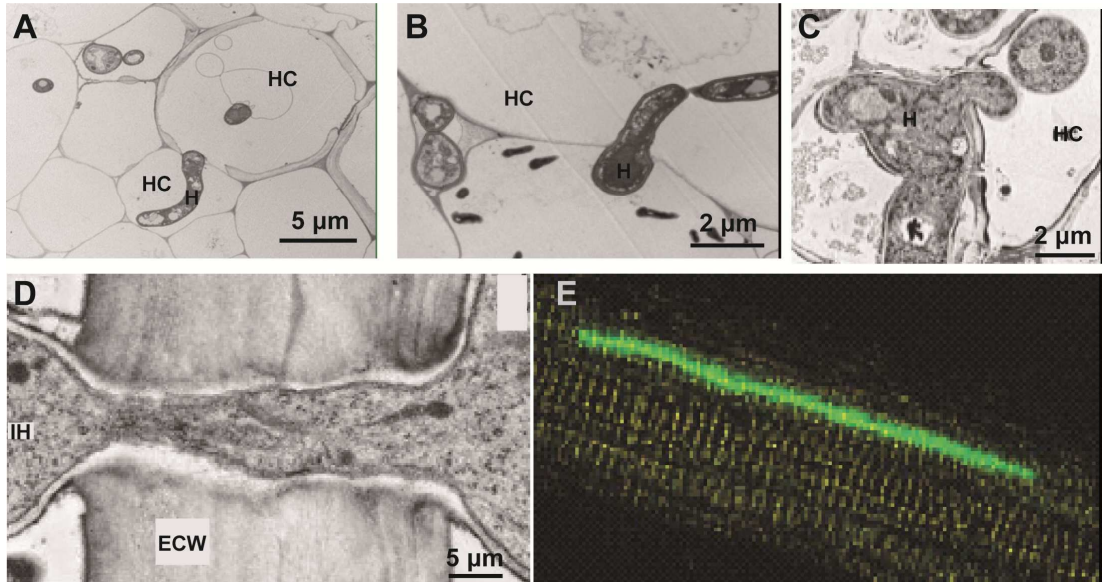


Figura 4. Mecanismo de infección de *F. oxysporum*. **A-C** Crecimiento inter e intracelular del hongo en las células parenquimáticas de la planta, dos días después de la infección (H = célula hifal; HC = célula del hospedador) (Mary Wanjiru et al, 2002; Pareja-Jaime et al, 2010). **D** Penetración de una hifa infectiva de *Fusarium* a través de la pared celular epidérmica vegetal (ECW = pared celular epidérmica; IH = hifa de infección). **E** Hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* portador del gen *gfp* en el interior de los vasos del xilema de tomate (Di Pietro et al, 2001).

2.1.4. Genes esenciales para la patogénesis

En *F. oxysporum* se han empleado dos aproximaciones experimentales para la identificación de genes esenciales en patogénesis (Di Pietro et al, 2003): la anulación dirigida de genes responsables de proteínas con función conocida y presumiblemente relevantes durante el proceso de infección; y alternativamente, la inserción al azar de fragmentos de ADN, por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot et al, 1998) o integración de elementos móviles (Li Destri Nicosia et al, 2001; Lopez-Berges et al, 2009) y la posterior identificación del gen interrumpido (Madrid et al, 2003). La anulación dirigida de genes ha sido el método que ha generado mayor información. La tabla 1 resume los genes caracterizados en *F. oxysporum*, esenciales en patogénesis.

Tabla 1. Genes de *F. oxysporum* que intervienen en patogénesis estudiados por interrupción.

Gen	Anotación	Virulencia en planta	Referencia
<i>velB</i>	Ortólogo de Velvet B	reducida	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2012a
<i>laeA</i>	Regulador de metabolitos secundarios	reducida	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2012a
<i>fhk1</i>	Histidina quinasa	reducida	Rispail y Di Pietro, 2010
<i>ste12</i>	Factor de transcripción	reducida	Rispail y Di Pietro, 2009
<i>meaB</i>	Factor de transcripción bZIP; Represor del catabolismo del nitrógeno	reducida	López-Berges <i>et al.</i> , 2009
<i>areA</i>	Factor de transcripción GATA; Activador del catabolismo del nitrógeno	reducida	López-Berges <i>et al.</i> , 2010
<i>chsV</i>	Quitin sintasa clase V	avirulento	Madrid <i>et al.</i> , 2003
<i>chsV/chsVb</i>	Quitin sintasa clase V / Quitin sintasa clase VII	avirulento	Martin Urdiruz <i>et al.</i> , 2008
<i>chsVb</i>	Quitin sintasa clase VII	avirulento	Martin Urdiruz <i>et al.</i> , 2008
<i>clc1</i>	Canal de cloro dependiente de voltaje	reducida	Cañero y Roncero, 2008
<i>hapX</i>	Factor de transcripción bZIP; Regulador de la homeostasis del hierro	reducida	López-Berges <i>et al.</i> , 2012b
<i>fmk1</i>	MAP quinasa	avirulento	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001
<i>fmk1/fhk1</i>	MAPK / Histidina quinasa	avirulento	Rispail y Di Pietro, 2010
<i>fmk1/fso1</i>	Proteína WW	avirulento	Prados Rosales y Di Pietro, 2008
<i>fmk1/msb2</i>	MAP quinasa / Mucina	avirulento	Perez-Nadales y Di Pietro, 2011
<i>fmk1/fgb1</i>	MAP quinasa / Subunidad b de proteína G	avirulento	Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005
<i>sst2</i>	Regulador de proteínas G	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2010
<i>msb2</i>	Mucina transmembrana	reducida	Perez-Nadales y Di Pietro, 2011
<i>chs7</i>	Chaperona de quitin sintasas	reducido	Martin Urdiruz <i>et al.</i> , 2004
<i>chs2</i>	Quitin sintasa 2	reducida	Martin Urdiruz <i>et al.</i> , 2004
<i>veA</i>	Proteína Velvet; respuesta a la luz, desarrollo y metabolismo secundario	reducida	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2012a
<i>fgb1</i>	Subunidad b de proteínas G	reducida	Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005
<i>abc3</i>	Transportador de varias drogas	reducida	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2012a
<i>beas</i>	Beauvericina-enniatina sintasa	reducida	Lopez-Berges <i>et al.</i> , 2012a
<i>rho1</i>	GTPasa tipo Rho	avirulento	Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008
<i>tom1</i>	Tomatina 1	reducida	Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2008
<i>gas1</i>	Beta-1,3-glucanosiltransferasa	avirulento	Caracuel <i>et al.</i> , 2005
<i>fga1</i>	Subunidad a de proteína G	reducida	Jain <i>et al.</i> , 2002

<i>fga2</i>	Subunidad a de proteína G	avirulento	Jain <i>et al.</i> , 2005
<i>fnr1</i>	Factor de transcripción	reducida	Divon <i>et al.</i> , 2006
<i>frp1</i>	Proteína F-box	avirulento	Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2006
<i>snf1</i>	Proteína quinasa	reducida	Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 2003
<i>cmle1</i>	Carboxy-cis, cis-muconato ciclasa	avirulento	Michielse <i>et al.</i> , 2012
<i>pacC</i>	Factor de transcripción	muy virulento	Caracuel <i>et al.</i> , 2005
<i>arg1</i>	Argiinosucinato liasa	reducida	Namiki <i>et al.</i> , 2001
<i>cti6</i>	Factor de transcripción	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>dcw1</i>	Proteína de pared	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>fow1</i>	Transportador mitocondrial	reducida	Inoue <i>et al.</i> , 2002
<i>fow2</i>	Factor de transcripción	avirulento	Imazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>fpd1</i>	Proteína reguladora	reducida	Kawabe <i>et al.</i> , 2004
<i>ftf1</i>	Factor de transcripción	reducida	Ramos <i>et al.</i> , 2007
<i>pex12</i>	Peroxina	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>pex26</i>	Peroxina	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>sge1</i>	Factor de transcripción	avirulento	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>six1</i>	Proteína efectora	reducida	Rep <i>et al.</i> , 2005

2.1.5 Control de la fusariosis

El control de esta enfermedad se realiza principalmente mediante fumigación del suelo con agentes químicos y el empleo de variedades de plantas resistentes. La sociedad demanda alimentos libres de residuos químicos y está concienciada de la necesidad de preservar el medio ambiente, por lo cual son necesarios métodos alternativos de control que incluyen la solarización del suelo o el uso de agentes de biocontrol, como microorganismos antagonistas o aislados de *Fusarium* no patógenos (Alabouvette et al, 2006; Fravel et al, 2003). Por ello son necesarias nuevas estrategias de control de la enfermedad, que requieren un conocimiento preciso de las bases moleculares del proceso de patogénesis que permita encontrar nuevas dianas y diseñar antibióticos con acción dirigida, o compuestos y agentes que controlen de forma ecológica estas plagas.

OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis ha sido profundizar en el conocimiento de algunas de las bases moleculares que determinan la virulencia del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate, en particular del papel de las enzimas involucradas en la hidrólisis de componentes estructurales y funcionales del hospedador. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda y caracterización *in silico* de los genes estructurales y reguladores relacionados con lipasas y poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum*.
2. Caracterización bioquímica del perfil de lipasas de *F. oxysporum*.
3. Análisis del perfil de expresión génica de lipasas y poligalacturonasas durante el proceso de infección de plantas de tomate por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
4. Estudio del papel de los reguladores de lipasas Ctf1 y Ctf2 en la virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante interrupción dirigida por reemplazamiento génico: Caracterización bioquímica y patotípica de los mutantes obtenidos.
5. Estudio del papel de las principales lipasas en la virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante interrupción dirigida por reemplazamiento génico: Caracterización bioquímica y patotípica de los mutantes obtenidos.
6. Estudio del papel de las principales poligalacturonasas en la virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante interrupción dirigida por reemplazamiento génico: Caracterización bioquímica y patotípica de los mutantes obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1. Material biológico

Las estirpes bacterianas, los hongos y los cultivares de plantas utilizados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Material biológico empleado.

Especie	Estirpe/Cultivar	Características genéticas
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> . Receptora en experimentos de transformación genética para amplificación de plásmidos, PCR y secuenciación de ADN
<i>Fusarium oxysporum</i>	4287	Estirpe silvestre (f. sp. <i>Lycopersici</i> , raza 2) (Dr. J. Tello ¹)
	Δ <i>lip1</i>	gen estructural lipasa 1 delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>lip2</i>	gen estructural lipasa 2 delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>lip3</i>	gen estructural lipasa 3 delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>lip5</i>	gen estructural lipasa 5 delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>lip22</i>	gen estructural lipasa 22 delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>ctf1</i>	gen regulador de lipasas <i>ctf1</i> delecionado (esta Tesis) y Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008
	Δ <i>ctf2</i>	gen regulador de lipasas <i>ctf2</i> delecionado (esta Tesis)
	Δ <i>ctf1</i> Δ <i>ctf2</i>	genes reguladores de lipasas <i>ctf1</i> y <i>ctf2</i> delecionados (esta Tesis)
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Daniella (Fruto)	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	Money Maker ²	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

¹Dpto. Producción vegetal, Universidad de Almería; ²cedida por Syngenta Seeds, (Almería).

El comportamiento de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* fue periódicamente confirmado mediante ensayos de infección de plantas.

1.2. Medios

Los medios se esterilizaron usando un autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos, o mediante filtración (*Millipore* con diámetro de poro de 0.22 µm). Los medios sólidos fueron fundidos y repartidos en placas Petri antes de su solidificación.

1.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

A. Medio Luria-Bertani:

Líquido (LB): bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (5 g/l). Suplementado con 0.005 % de ampicilina (p/v) para seleccionar estirpes resistentes.

Sólido (LA): medio líquido LB suplementado con 15 g/l de bactoagar. Suplementado con 0.005 % de ampicilina (p/v) para seleccionar estirpes resistentes.

B. Medio LA, X-GAL, IPTG y Ampicilina:

Medio LA suplementado con 134 µM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), 0.005% (p/v) X-Gal (disuelto en formamida) y 0.005% ampicilina (p/v).

1.2.2. Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*

A. Medio nutritivo:

Líquido (PDB): Hervir 200 g de patatas peladas y troceadas en 1 l de agua durante 60 minutos. Filtrar, añadir 20 g de glucosa, enrasar hasta 1 l y esterilizar en el autoclave.

Sólido (PDA): 3.9% (p/v) de un compuesto constituido por agar, patata peptona y glucosa (Scharlau Microbiology).

Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 µg/ml en PDB y 55 µg/ml en PDA) o fleomicina (1.6 µg/ml en PDB y 4 µg/ml en PDA). El pH del medio se ajustó a 8 con NaOH cuando contenía fleomicina.

B. Medio sintético de ARNE (SM):

Líquido: MgSO₄ x 7H₂O (0.2 g/l), KH₂PO₄ (0.4 g/l), KCl (0.2 g/l), NH₄NO₂ (1g/l), FeSO₄ (0.01 g/l), ZnSO₄ (0.01 g/l) y MnSO₄ (0.01 g/l).

Sólido: Medio líquido suplementado con 15 g/l de bactoagar.

Este medio fue suplementado con diferentes fuentes de carbono según el experimento.

C. Medio mínimo de regeneración:

Líquido: MgSO₄ x 7 H₂O (0.5 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), KCl (0.5 g/l), NaNO₃ (2 g/l), glucosa (20 g/l) y sacarosa (200 g/l).

Sólido: Medio líquido suplementado con bactoagar 12.5 g/l para medio sólido ó 4 g/l para agar de cobertera.

1.3 Compuestos químicos y kits

Los compuestos químicos y los kits usados durante este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Compuestos químicos usados en este trabajo.

Nombre del compuesto	Casa comercial	Almacenamiento
1 KB plus DNA Marker	Enzimax	4 °C
40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1	Bio-Rad	4 °C
Aceite de germen de trigo (WGO)	Sigma	Temperatura ambiente
Aceite de Oliva	Aceite comercial (Carbonell)	Temperatura ambiente
Acetato de amonio (NH ₄ Ac)	Merck	Temperatura ambiente
Acetato de sodio (NaAc)	Sigma	Temperatura ambiente
Acetato potásico (KAc)	Meck	Temperatura ambiente
Ácido aurintricarboxílico (ATA)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido erúcico	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido maleico	Merck	Temperatura ambiente
Ácido ortofosfórico	Panreac	Temperatura ambiente
Agar bacteriológico (Bactoagar)	Oxoid	Temperatura ambiente
Agarosa	Pronadisa	Temperatura ambiente
Amonio nitrato (NH ₄ NO ₃)	Merck	Temperatura ambiente
Amonio persulfato (APS)	Sigma	Temperatura ambiente
Ampicillin Sodium salt (Ampicilina)	Sigma	4 °C
Anfolitos (Bio-Lyte® 3/10)	Bio-Rad	4 °C
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche	4 °C
Azul Brillante-R	Sigma	Temperatura ambiente
Azul de bromofenol	Sigma	Temperatura ambiente
Azul de metileno (4-o-Methyl-D-Glucurano-D-xylan-Remazol Brilliant Blue-R)	Sigma	Temperatura ambiente
Azul de xilencianol (Xylencyanol FF standard)	Flucka	Temperatura ambiente
Bis-Tris-propano	Sigma	Temperatura ambiente
Bromuro de etidio	Amresco	Temperatura ambiente
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	Sigma	Temperatura ambiente
Butirato de sodio	Sigma	-20 °C
CDP-STAR	Roche	4 °C

Citrato de sodio	Merck	Temperatura ambiente
Cloroformo	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de Litio (CLi)	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	Sigma	Temperatura ambiente
Cloruro de potasio (KCl)	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de sodio (NaCl)	Merck	Temperatura ambiente
Cóctel inhibidor de proteasas	Sigma	-20 °C
Dig DNA Labeling Mix	Roche	-20 °C
DIG Easy Hyb Granules	Roche	Temperatura ambiente
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Merck	Temperatura ambiente
Disodio hidrogenofosfato (Na ₂ PHO ₄)	Merck	Temperatura ambiente
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Serva	Temperatura ambiente
Etanol	Panreac	Temperatura ambiente
Extracto de levadura	Merck	Temperatura ambiente
Fleomicina	InvivoGen	-20 °C
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma	Temperatura ambiente
Formamida	Sigma	4 °C
Glicerol	Merck	Temperatura ambiente
Glicerol tributirato	Sigma	4 °C
Glicerol trioleato	Sigma	4 °C
Glicerol tripalmitato	Sigma	-20 °C
Glicina	Merck	Temperatura ambiente
Glucanex®-100G (mezcla enzimas líticas)	Novozymes	4° C
Glucosa	VWR Prolabo®	Temperatura ambiente
Goma arábica de acacia	Sigma	Temperatura ambiente
Hidróxido de sodio (NaOH)	Merck	Temperatura ambiente
Higromicina B (HidroGold™)	InvivoGen	-20 °C
iQ SyBR Green Supermix	Bio-Rad	-20 °C
Isopropanol	Merck	Temperatura ambiente
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	Apollo	-20 °C

Lisozima	Sigma	-20 °C
Metanol	J.T. Baker	Temperatura ambiente
MOPS	Sigma	Temperatura ambiente
N; N; N'; N'-Tetrametiletilenediamina (Temed)	Sigma	4° C
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₂)	Panreac	Temperatura ambiente
Nitrato de hierro (FeNO ₃)	Merck	Temperatura ambiente
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	Merck	Temperatura ambiente
Octanol	Panreac	Temperatura ambiente
p-nitrofenil	Sigma	Temperatura ambiente
p-nitrofenil palmitato	Sigma	Temperatura ambiente
Polietilenglicol 35000 (PEG 35 K Mr)	Flucka Chemika-Biochemika	4 °C
Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	Merck	Temperatura ambiente
Potasio dihidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄)	Merck	Temperatura ambiente
Potasio hidróxido (KOH)	Merck	Temperatura ambiente
Potato Dextrose Agar (PDA)	Scharlau	Temperatura ambiente
ProSieve® Quad Color (marcador de tamaño de proteína)	ProSieve	-20 °C
Proteín assay (Ácido fosforico y metanol)	Bio-Rad	4 °C
Ribonucleasa A (ARNasa)	Fermentas	-20 °C
RNasin® Plus (Inhibidor de ARNasa)	Promega	-20 °C
Sacarosa	Merck	Temperatura ambiente
Sero albúmina bovina Fracción V (BSA)	Roche	4 °C
Sodio oleato	Sigma	-20 °C
Sorbitol	Sigma	Temperatura ambiente
Sulfato de hierro (FeSO ₄)	Sigma	Temperatura ambiente
Sulfato de magnesio hepta hidratado (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	Merck	Temperatura ambiente
Sulfato de manganeso (MnSO ₄)	Merck	Temperatura ambiente
Sulfato de zinc (ZnSO ₄)	Sigma	Temperatura ambiente
Tiptona	Merck	Temperatura ambiente
Titriplex®I (EDTA)	Merck	Temperatura ambiente
Tripure Isolation Reagent	Roche	4 °C
Tritón X-100	Sigma	Temperatura ambiente

Trizma base	Sigma	Temperatura ambiente
Tween 20	Sigma	Temperatura ambiente
Tween 80	Sigma	Temperatura ambiente
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)	Sigma	-20 °C
β -mercaptoetanol	Merck	4° C
Kits	Casa comercial	Almacenamiento
Rneasy Plant MiniKit	Qiagen	Temperatura ambiente
GeneClean® Turbo	MP	Temperatura ambiente
pGEM®-T Vector System	Promega	-20 °C
pSpark® I DNA cloning system	Canvax	-20 °C
Expand High Fidelity PCR System	Roche	-20 °C
Dnase I Kit	Fermentas	-20 °C
M-MLV Reverse Transcriptase kit	Invitrogen	-20 °C
BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline	-20°C

1.4 Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos que fueron utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación y secuenciación se diseñaron con el programa *Oligo* (Molecular Biology Insights, Inc.), optimizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de horquillas y dímeros no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m , %G + C, %A + T). Los oligonucleótidos se sintetizaron en la empresa comercial *Eurofins MWG Operon*.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias terminales incluidas para favorecer la hibridación con el extremo 3' o 5' de los casetes de resistencia a higromicina o fleomicina en minúscula.

Oligo	Secuencia (5' → 3')	Posición al ATG	Uso experimental
act-q7	ATGTCACCACCTTCAACTCCA	+ 1278 (s)	qRT-PCR, expresión génica
act-q8	CTCTCGTCGTACTIONCTGCTT	+ 1578 (as)	qRT-PCR, expresión génica

hyg-Y	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA	+ 735 (as)	delección génica, análisis Southern
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	+ 289 (s)	delección génica, análisis Southern
TtrpC-8B	AAACAAGTGTACCTGTGCATTC	+ 1727 (as)	delección génica
PgpdA-15B	CGAGACCTAATACAGCCCCT	- 1020 (s)	delección génica
PHL-1	CGAACTCCCGCCCCACG	+ 301 (as)	delección génica
PHL-2	AGTTGACCAGTGCCGTTCCG	+ 7 (s)	delección génica
lip1-1	GCTACCATCGTGACATCTTTC	+ 208 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip1-2	CCACATCCAGAGACGAGACT	+ 482 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip1-3	AAGAGGATGAGATGGTGTGAAG	- 1343 (s)	delección génica
lip1-4	CTGGGTTAGGTATCGTGTTC	- 1070 (s)	delección génica, análisis Southern
lip1-5	CCAGAGACTTTGCCCTTTTC	+ 2557 (as)	delección génica
lip1-6	AGCATCTCGACTTCAGTTACA	+ 1965 (as)	delección génica
lip1-7	TGGTTTGAGACGAAGGCTGAG	+ 721 (as)	Análisis Southern
lip1-8	TGGGTGTAAGTGAGGATAGGC	- 47 (as)	Análisis Southern
lip1-M13F	gtcgtgactgggaaaaccctggcgTGGGT GTAAGTGAGGATAGGC	- 47 (as)	delección génica
lip1-M13R	tcctgtgtaaattgtatccgctGAGCATTA GGAACACCAACAAG	+ 1372 (s)	delección génica
M13F-lip1	gcctatcctcacttacaccaCGCCAGGG TTTTCCCAGTCACGAC	- 1246 (s)	delección génica
M13R-lip1	cttgttggttccctaatgctcAGCGGATAA CAATTTACACAGGA	+ 1851 (as)	delección génica
lip1.2-1	AATAACGGGTACAGCACAGAC	+ 771 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip1.2-2	GTCGAGATGTAGTATTCTGGG	+ 994 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip2-1	CACCACAGGAGTCAGAAAACC	+ 203 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip2-2	GGAGACGGGTACGGCACATA	+ 456 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip2-3	TAAACACACATACTACATCCCTC	- 1374 (s)	delección génica
lip2-4	TTCGGACTTTTGCTTTTTTCTGC	- 1332 (s)	delección génica
lip2-5	ACGACTTCCACTACCGCCAG	+ 2675 (as)	delección génica
lip2-6	AGAGTCTACCATTCATACGCCT	+ 2643 (as)	delección génica
lip2-7	GCTATGGCTCCTTGCTGAACA	+ 625 (as)	Análisis Southern
lip2-8	CCGACTTCCGCTCCAACG	- 517 (s)	Análisis Southern
lip2-TtrpC-8B	tftaccagaatgcacaggtacactgtttGTC CCCAATCCTCGCTCTGT	- 114 (as)	delección génica, análisis Southern

lip2-PgpdA-15B	tggtcgtgttaggggctgtattaggtctcgAGT CTCAAGCGTCTAAAACCCA	+ 1390 (s)	delección génica
lip3-1	GGGCCTCAGCAGCATGTTC	+ 2 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip3-2	AGCCTGGAACCTGGAACGAG	+ 281 (as)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip3-3	GCCGTTACTTCTGTGGAGAG	- 1169 (s)	delección génica
lip3-4	CCGAAGTCAAAGGGCACCA	- 1126 (s)	delección génica
lip3-5	TCCTTGACTCGTTCCCCGTA	+ 2909 (as)	delección génica
lip3-6	CCTGACTTTCTCTTGCCCGT	+ 2877 (as)	delección génica, análisis Southern
lip3-TtrpC-8B	tttaccagaatgcacaggtacactgtttGGA ATGTGATGAGACGGGAC	- 25 (as)	delección génica
lip3-PgpdA-15B	tggtcgtgttaggggctgtattaggtctcgCGA GATATGAATAGTGTGGGA	+ 1866 (s)	delección génica, análisis Southern
lip5-1	CCTGGAGATAAAGTCATTCAA	+ 222 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip5-2	CTCAAACAATCTTCAGTGGTAT	+ 352 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip5-3	GCATAAAGGTCAACATACTCGG	- 1122 (s)	delección génica
lip5-4	TCAATCTATCATCACGAAACACG	- 1094 (s)	delección génica
lip5-5	TGAAGTTGGCATCGGCTGTAG	+ 2704 (as)	delección génica
lip5-6	GAATGGTCTTGGTGGCTCTAC	+ 2659 (as)	delección génica
lip5-7	GCGAAAGATGGACGGTTGCC	+ 420 (s)	Análisis Southern
lip5-8	ATCCCCAGACTTCCCTCAAT	+ 813 (as)	Análisis Southern
lip5-TtrpC-8B	tttaccagaatgcacaggtacactgtttTATA CACGACCCGCATCAACAA	- 89 (as)	delección génica
lip5-PgpdA-15B	tggtcgtgttaggggctgtattaggtctcgGCG TTATGGTATTATTTGTCCCT	+ 1686 (s)	delección génica
lip10-1	CTGAGTTCGGATGGATGTGTA	+ 385 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip10-2	TGATGGAGGCAGCGACAATG	+ 670 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip11-1	GGTGCGAGTTAAGAATGGTAC	+ 74 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip11-2	TGTTGCCCTTGGACATAGCG	+ 374 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip13-1	AAGAACGAGCAGCCAAAGTCA	+ 127 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip13-2	TGGGGGTAAGGAAGGGAATG	+ 386 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip15-1	CTAGAGAGAGCGAAGATTGTC	+ 498 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip15-2	TCTCTGGTCGTAAAGTGCCG	+ 877 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip20-1	GCCGCCAAAGCCCATTAAG	+ 203 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip20-2	TGGGACTTGGTGTCTGTGG	+ 399 (as)	qRT-PCR, expresión génica

lip21-1	TACCCTATGCCAAACCACCG	+ 163 (s)	qRT-PCR, expresión génica
lip21-2	GTCTTCGGTTTCGTTTCCTAAT	+ 353 (as)	qRT-PCR, expresión génica
lip22-1	CTGAACCTCTCCCACCCAG	+ 91 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip22-2	TTGAACAGGGTCCGACAGCAGT	+ 318 (as)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
lip22-3	TGGAAATTGTGCCTCTTTATCTA	- 1148 (s)	delección génica
lip22-4	TAGGAAGTGTAGGCATGAGGT	- 1076 (s)	delección génica, análisis Southern
lip22-5	ATTATACTCTTCCCTCAACGCT	+ 2500 (as)	delección génica
lip22-6	GCCTATCATTCTTTCAGCCCT	+ 2455 (as)	delección génica
lip22-TtrpC-8B	tttaccagaatgcacaggtacactgtttGAA GTATGATGTAATTGACCGC	- 25 (as)	delección génica, análisis Southern
lip22-PgpdA-15B	tggtcgtgtaggggctgtattaggtctcgTTAT GATGCTTGGGTCTGGTG	+ 1381 (s)	delección génica
ctf1-1	GCAGCCAAACCAATAAAGACTC	+ 632 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
ctf1-2	TCAAGATAGGTCCCCTGTGCG	+ 879 (as)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
ctf1-3	CTGTGGACCCTCTTCAACTGA	- 1072 (s)	delección génica
ctf1-5	TCGTTCTAACTCAGGACAAGGT	+ 4399 (as)	delección génica, análisis Southern
ctf1-6	CAGACCTTCACGGGCTTTGC	+ 4249 (as)	delección génica
ctf1-TtrpC-8B	tttaccagaatgcacaggtacactgtttGAA TCGGAAATGTCGGGGGC	- 33 (as)	delección génica
ctf1-PgpdA-15B	tggtcgtgtaggggctgtattaggtctcgCAC GGTCTCTGATAAAGTTTGC	+ 3358 (s)	delección génica, análisis Southern
ctf2-1	TCTCGGTATCATCAACAGTCGT	+ 1346 (s)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
ctf2-2	TCTGGTCATCTGGCGTCTCAT	+ 1635 (as)	qRT-PCR, expresión génica, análisis Southern
ctf2-3	AAAAGACCAGACTCAAGGGATG	- 1336 (s)	delección génica
ctf2-4	CTGCCAACAACAAGTCAAGTGA	- 1150 (s)	delección génica
ctf2-5	CCCTTCTCCACTCTCTAATA	+ 4393 (as)	delección génica
ctf2-6	ATCTTCTTTATTCCATCACAGGC	+ 4314 (as)	delección génica
ctf2-TtrpC-8B	tttaccagaatgcacaggtacactgtttCCA ATAAGTGCCTAATGCTGTC	- 90 (as)	delección génica
ctf2-PgpdA-15B	tggtcgtgtaggggctgtattaggtctcgCGG GGCGTTTGGGCTGTTG	+ 3316 (s)	delección génica
pg1-1	GCAGCGTCACTGACTACTCC	+ 140 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg1-2	GTTAGAACCTTCGCCATCCCA	+ 449 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg1-3	GGCATAGAGGGGGAAAGCAA	- 1111 (s)	delección génica

pg1-4	TTATTACCCCGTACCCCGCA	- 1076 (s)	delección génica
pg1-5	tftaccagaatgcacaggtacactgtttCGA GTGAGACAAAGACAAGAG	- 30 (as)	delección génica
pg1-6	AGGAGGTGGAGAAGAAAGCC	+ 2397 (as)	delección génica
pg1-7	ACGGTGCTGTGATCTATGAAG	+ 2319 (as)	delección génica
pg1-8	tggctgttaggggctgtattaggtctcgCTAA GCGGGACGATCATCAC	+ 1340 (s)	delección génica
pgx4-1	GTACAGCATTGCCTCGCCAC	+ 295 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pgx4-2	CGGGTTTCTCATTGCGAGGTT	+ 662 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg5-1	GCCTGGTCGCCTCCGTA	+ 47 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg5-2	TCTTCTTGCCGCCGTTGCTGCC TTGCCG	+ 418 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg6-1	TCAGCGATGGTGAACAGTT	+ 527 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg6-2	GATGTCCTTGGAGGTGACGA	+ 777 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg6-3	AGAACGAGAGAGAGCTGTAGA	- 1125 (s)	delección génica
pg6-4	AGTAATGAGCTTGTGGTTCGG	- 1093 (s)	delección génica
pg6-5	tftaccagaatgcacaggtacactgtttCAG AAGATGAGTTGGCTTGAG	- 40 (as)	delección génica
pg6-6	CAGTGGGACAGTATTCGATGA	+ 2625 (as)	delección génica
pg6-7	TCGGTAGGCAAACAATCAGTAA	+ 2594 (as)	delección génica
pg6-8	tggctgttaggggctgtattaggtctcgGAC GGGGTTTGTGGTAATTAG	+ 1615 (s)	delección génica
pg7-1	TCCAAGTACACGACCCTTTCAA	+ 664 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg7-2	GCTGTTCAATAAAGACTCGTC	+ 997 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg8-1	CTCACTATCAACCAATCACTC	+ 538 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg8-2	CACTGCCGATGGAGAGACC	+ 778 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg9-1	GCTACTCCATTCCAACCTCAA	+ 73 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg9-2	GCCGTTTCCCGAGATAGTAAT	+ 400 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg13-1	GGGGAGGAAAGGACATTAGAA	+ 481 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg13-2	GTTGTTGGACAGTGCGGTTG	+ 826 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg14-1	ATGCTTCCTCCTTCTTGGTCA	+ 49 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg14-2	GAGATGAGGTGTGCTTGATAG	+ 250 (as)	qRT-PCR, expresión génica
pg15-1	AAGACCTACGCCGCTCCTG	+ 43 (s)	qRT-PCR, expresión génica
pg15-2	GTTATCACCATCAATCACAGAC	+ 306 (as)	qRT-PCR, expresión génica

1.5 Vectores de clonación

Los vectores de clonación universales usados se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Vectores de clonación

Plásmido	Características	Referencias
pGem [®] -T	Derivado de pGem [®] -5Zf(+), linealizado con la enzima <i>Eco</i> RV y con una T en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con Adenina en sus extremos. Confiere resistencia a ampicilina	Promega
pAN7-1	Portador del gen <i>hph</i> bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i>	Punt <i>et al.</i> , 1987
pAN8-1	Portador del gen de resistencia a fleomicina bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> clonados en pUC18 <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I	Mattern <i>et al.</i> , 1988
pSpark [®] I	Linealizado con <i>Eco</i> RV, permite la clonación de fragmentos de PCR con extremos romos. Confiere resistencia a ampicilina	Canvax, Biotech

1.6 Programas informáticos y páginas webs

Los programas informáticos y las páginas webs usados para el desarrollo de este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Programas informáticos y páginas webs usados en esta tesis.

Programas informáticos		
Programa	Detalles	Aplicación
Adobe illustrator CS3	Adobe systems Incorporated (v13.0.0)	Elaboración y tratamiento de figuras
Adobe photoshop CS3	Adobe systems incorporated (v10.0)	Edición de imágenes
Bioedit	Tom Hall 1997-2007 (v7.0.9.0)	Edición de alineamientos de secuencias
Image Reader LAS-3000	Fuji Photo Film Co. 2002-2004 (v2.0)	Captura de imágenes obtenidas tras revelado mediante detección quimiluminiscente con LAS-3000
Gblocks	Jose Castresana 2002 (v0.91b)	Edición preparativa para elaborar árboles filogenéticos mediante eliminación automática de interrupciones en los alineamientos de secuencias obtenidos previamente
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. 1992-2007 (v5.00)	Elaboración de gráficos
ImageJ	Wayne Rasband (v1.41o)	Edición de imágenes fotográficas de geles de agarosa
Kodak 1D Image Análisis	Kodak Scientific Imaginf System 1994-2000 (v3.5.4)	Captura de imágenes fotográficas de geles de agarosa
Mega4	Tamura <i>et al.</i> , 1993-2008 (v4.0.2)	Construcción de árboles filogenéticos
Modelgenerator	Thomas Keane <i>Et al.</i> , 2006 (v0.85)	Identificación del modelo de sustitución adecuado para la elaboración de árboles filogenéticos
Oligo	Molecular Biology Insights, Inc. (v7.54)	Diseño y análisis de oligonucleótidos
PhyML	Guindon y Gascuel 2003 (v3.0)	Análisis de alineamientos de secuencias resultantes para la generación de árboles filogenéticos
SeqBuilder	DNASTar Lasergene (v. 7.0.0)	Edición y análisis de secuencias nucleotídicas o proteicas
SeqMan	DNASTar Lasergene (v7.0.0)	Ensamblaje de secuencias de ADN en Contigs

Páginas webs		
Nombre	Dirección	Aplicación
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Análisis y comparación de secuencias nucleotídicas o proteicas análogas usando el algoritmo <i>BLAST</i> (Blastn, Blastp, Blastx, tBlastx)
Broad Institute Fusarium Comparative Database	http://www.broadinstitute.org	Búsqueda de secuencias nucleotídicas o proteicas usando el algoritmo <i>BLAST</i> (Blastn, Blastp, Blastx, tBlastx)
Scansite	http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html	Cálculo teórico del peso molecular, según datos de la UIPAC, y del pI usando el algoritmo <i>ExPASy</i>
Center for biological sequence analysis (cbs)	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Identificación del péptido señal de proteínas usando SignalP v4.0

1.7 Aparatos utilizados

Los aparatos científicos usados durante este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Aparatos utilizados

Aparatos	Aplicación
Agitador magnético MC-8 Bunsen	Homogenizar muestras de gran volumen
Autoclave Presoclave P-Selecta	Esterilización de materiales y medios
Balanza LE225D Sartorius	Pesar compuestos y muestras biológicas
Balanza precisión Cobos	Pesar compuestos y muestras biológicas
Centrífuga J2-HS Beckman	Centrifugación de muestras (50-200 ml)
Centrífuga MiniSpin Eppendorf	Centrifugación de muestras (1.5-2 ml)
Escáner Perfection 4490 Photo Epson	Escanear imágenes
Espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop®	Determinación de absorbancia y para la cuatificación de ácidos nucleicos
Estación de hibridación Oven/Shaker SI20H Stuart Scientific	Hibridación de membranas (Southern)

Fluorímetro SPECTRAFluor Plus Tecan	Determinación de absorbancia en placas microtiter de 96 pocillos
Homogenizador MINI BEADBEATER-8 BiosPEC	Homogenización de muestras usando bolas de vidrio (GlassBeads)
Liofilizador Virtis	Liofilización de muestras
Máquina fotográfica Coolpix S5 Nikon	Obtención de imágenes fotográficas
Máquina fotográfica DC290 ZOOM Kodak	Obtenención de imágenes fotográficas de geles de agarosa
pHmetro BASIC 20+ Crison	Medición del pH de muestras
Revelador LAS-3000 Fujifilm	Revelado de imágenes de membranas de hibridación (Southern)
Rotofor®Cell Bio-Rad	Separación de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque
SeedVac Savant DNA 120 Concentrator Thermo Scientific	Concentración de muestras mediante vacío
Sonicador SONOPULS Bandelin	Homogenización de muestras por sonicación
Termobloque ThermoStat Plus Eppendorf	Incubación a temperatura constante de viales (1.5 o 2 ml)
Termociclador MJ Mini™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad	Amplificación de ADN mediante PCR
Termociclador iCycler iQ real-time PCR system Bio-Rad	Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa
Termociclador TC-3000G Techne	Amplificación de ADN mediante PCR
Vortex MS2 Minishaker IKA®	Homogenización de muestras de volumen pequeño

2. Crecimiento y mantenimiento de organismos biológicos

2.1 Bacterias

La bacteria *E. coli* se cultivó a 37 °C, con agitación (250 rpm) si se trataba de medio líquido, y en estufas si era en medio sólido, con el antibiótico de selección ampicilina para estirpes portadoras de plásmidos con el gen de resistencia.

La conservación de estirpes bacterianas durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio LB con 30% glicerol (v/v). Para períodos muy cortos se mantuvieron a 4 °C, tanto en medio LB como en medio LA.

2.2 Fusarium oxysporum

Los cultivos del hongo se incubaron a 28 °C. En medio líquido, la incubación se realizó con agitación orbital (170 rpm). Al medio se le añadió higromicina o fleomicina para la selección y cultivo de estirpes resistentes.

Para la conservación de las estirpes, se recogieron esporas de un cultivo de 3-5 días en medio PDB. Para ello, se filtró a través de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) para separar el micelio, que se secó con papel de filtro y se conservó a -80 °C hasta su utilización, y el filtrado con las esporas se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. A continuación se resuspendió el precipitado en agua destilada estéril y se almacenó a -80 °C con 30% glicerol (v/v). Esta suspensión se utilizó como inóculo en experimentos posteriores.

2.3 Plantas

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en 20% hipoclorito sódico comercial (v/v) durante 30 minutos seguidos de 3 lavados con abundante agua de 10 minutos. Una vez sembradas en vermiculita humedecida, se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a una temperatura de 28 °C. Los ensayos de infección se realizaron con plantas de aproximadamente 14 días, con el primer par de hojas verdaderas. Para llevar a cabo la infección, las raíces se introdujeron en una dilución de esporas frescas del hongo.

3. Aislamiento de ácidos nucleicos

3.1 Purificación de ADN plasmídico de *E. coli* con CTAB

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson (Murray & Thompson, 1980), con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia aislada de la estirpe portadora del plásmido de interés en 5 ml de medio selectivo (LB con antibiótico). Después de 12-14 horas de incubación, se centrifugaron 3 ml del cultivo durante 3 minutos a 13000 rpm. Una

vez eliminado el sobrenadante, las células obtenidas se resuspendieron en 200 µl de solución STET⁽¹⁾. A continuación, se añadieron 4 µl de lisozima (50 mg/ml) para provocar la lisis celular y 2 µl de ribonucleasa A (ARNasa) (10 mg/ml) para eliminar el ARN contaminante, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, la muestra se calentó a 100 °C durante 45 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. Los restos celulares, que quedaron en el fondo del tubo con aspecto mucoso se retiraron con un palillo de dientes esterilizado. Se añadieron 10 µl de solución CTAB⁽²⁾ al sobrenadante resultante para precipitar el ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 µl de una solución 1.2 M NaCl y 750 µl de 100% etanol frío. Se homogenizó la muestra y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril.

⁽¹⁾**solución STET:** 8% sacarosa p/v; 0.1% Tritón X-100 v/v; 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

⁽²⁾**solución CTAB:** 5% bromuro de hexadeciltrimetilamonio p/v. Mantener a 37 °C para evitar que precipite.

3.2 Extracción de ADN de *F. oxysporum*

3.2.1 Método del CTAB

Para purificar ADN genómico (ADNg) se utilizó el micelio del hongo cultivado durante 3-4 días. Se siguió el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con modificaciones. Se pulverizaron unos 100 mg de micelio usando un mortero y nitrógeno líquido y el polvo resultante se transfirió a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de tampón de extracción CTAB⁽¹⁾ y se homogenizó vigorosamente, usando vortex. A continuación se añadieron 4 µl de β-mercaptoetanol y 500 µl de una solución cloroformo:octanol (24:1, v/v) y se volvió a homogenizar antes de incubar a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó 5 minutos a 10000 g. Al sobrenadante obtenido se le añadió 1 ml de etanol puro frío y se incubó a -20 °C durante 10 minutos, tras lo cual el ADN se precipitó haciéndose visible con aspecto de maraña blanquecina. El ADN se recogió con una varilla de vidrio, y se lavó sucesivamente con etanol puro y etanol al 75% (v/v), sumergiendo la varilla en 500 µl de cada dilución, finalmente se resuspendió en 100 µl

de agua desionizada estéril. Por último, se añadieron 4 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos.

⁽¹⁾**Tampón de extracción CTAB:** 12.1 g/l Trizma base; 7.44 g/l EDTA; 81.8 g/l NaCl y 20 g/l bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Para disolver, calentar a 60 °C y ajustar a pH 8.0 con NaOH. Llevar a 100 ml y almacenar a 37 °C para evitar que precipite.

3.2.1 Método de rotura con bolas de vidrio (Glass Beads)

Para la purificación de ADN por el método “Glass Beads” se utilizó el micelio obtenido de una colonia de 1 cm² del hongo en medio sólido. Este método requiere el uso de pequeñas bolas de cristal de 425-600 µm de diámetro estériles (Glass Beads; Sigma). En un tubo estéril de 2 ml se añadieron aproximadamente 0.3 g de Glass Beads, 500 µl de tampón de lisis⁽¹⁾ y el micelio. Las muestras se agitaron inicialmente en un vortex durante 1 minuto y a continuación en un Mini Beadbeater 3 veces durante 20 segundos. En este proceso las bolas de cristal machacan el micelio hasta partículas finas. Posteriormente se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm, tras lo cual el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml, al que se añadió 275 µl de una solución 7 M de Acetato de Amonio pH 7.0. A continuación las muestras se incubaron 5 minutos a 65 °C y otros 5 minutos en hielo para finalmente añadir 500 µl de cloroformo y ser homogenizadas en un vortex. Tras una nueva centrifugación de 3 minutos a 13000 rpm la fase superior obtenida se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml al cual se le añadió 1 ml de isopropanol y de nuevo se homogenizó para, a continuación, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm. Esta última centrifugación consigue que el ADN extraído se quede en el pellet, por lo cual el sobrenadante se desecha. El ADN se lavó dos veces añadiendo 1 ml de etanol al 70% (v/v), centrifugando 5 minutos a 13000 rpm y eliminando el sobrenadante. Finalmente las muestras se secaron en un SpeedVac y resuspendieron en 50 µl de agua desionizada estéril. Por último, se añadieron 4 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos.

⁽¹⁾**Tampón de lisis:** 100 mM Tris pH 8.0; 50 mM EDTA; 1% SDS.

3.3 Extracción de ARN de *F. oxysporum*

La extracción de ARN se realizó a partir de micelio obtenido tras inocular 1.25×10^8 esporas frescas, en 100 ml de medio PDB incubadas a 28 °C en agitación durante 12-14 horas. Pasado este tiempo, se recogieron por filtración las germínulas obtenidas, a través de un filtro (Monodur) donde quedaban retenidas. A continuación, se lavaron con agua estéril y se transfirieron al medio de inducción. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, se recogió el micelio utilizando un filtro de nailon, se secó con papel de filtro y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron en nitrógeno líquido 100 mg de micelio con ayuda de un mortero, y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de *Tripure Isolation Reagent* (Roche). Se homogenizó vigorosamente usando un vortex y se centrifugó a 4 °C, durante 10 minutos y 12000 g. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó en hielo durante 5 minutos, para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µl de cloroformo y se homogenizó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó en hielo durante 15 minutos. Después de centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 12000 g, la solución se separó en tres fases, de las cuales, la fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un vial, con 500 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos, tras lo cual, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos y 12000 g, para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de 75% etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos y a 7500 g, se secó en un SpeedVac, se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNasas y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 minutos. El ARN obtenido se conservó a -80 °C.

3.4 Extracción de ARN de plantas infectadas

La purificación de ARN a partir de raíces o tallos de plantas infectadas se llevó a cabo utilizando el kit comercial *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, se pulverizaron 100 mg de raíces o tallos de plantas infectadas y el polvo resultante se añadió un vial con tampón de lisis. A continuación se eliminaron los restos celulares por filtración y centrifugación en columna suministrada en el kit, y se añadió etanol 100% y tampón de adhesión para que el ARN se

adhiriera a la membrana utilizada. Después de varios lavados, el ARN se eluyó en un volumen de 35 µl de agua desionizada estéril y se conservó a -80 °C.

4. Manipulación de ácidos nucleicos

4.1 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa disuelta en tampón TAE⁽¹⁾. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0.7 y 2% (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Cada muestra se mezcló con tampón de carga⁽²⁾ para geles de agarosa en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm.

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con el marcador de tamaño *1 KB plus DNA Marker* (Enzimax), que contiene fragmentos desde 75 pb a 20 kb.

⁽¹⁾**Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8.0.

⁽²⁾**Tampón de carga:** 0.25% azul de bromofenol p/v; 0.25% azul de xilencianol p/v y 40% sacarosa p/v en 5 x TAE.

4.2 Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó empleando el kit comercial *GENECLEAN® Turbo kit* (MP), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y el pH adecuados para la unión del ADN a la membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

4.3 Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos

4.3.1 Tratamientos con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por Roche o Fermentas. Los tratamientos del ADN con una única enzima de restricción se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se emplearon 100 ng/μl de ADN plasmídico y 1-2 unidades de enzima por microgramo de ADN, sin superar nunca el 10% del volumen total. En el caso de los tratamientos de ADN_g para análisis *Southern*, se trataron 1-2 μg de ADN_g con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima durante 1- 3 horas. Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico.

4.3.2 Clonación de fragmentos de ADN en vectores

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial *pGEM[®]-T Vector System* (Promega) o el kit *pSpark[®] I DNA cloning system* (Canvax), siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera rutinaria, antes de la clonación los fragmentos se precipitaron con acetato de amonio y etanol puro, o bien, se purificaron utilizando el Kit comercial *GENECLEAN[®]*.

4.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la concentración de las muestras de ADN o ARN se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000, a una longitud de onda de 260 nm. En algunas ocasiones, se cuantificó por comparación de la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño *1 KB plus DNA Marker* (Enzimax), tras electroforesis en gel de agarosa.

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.5.1 PCR estándar

Según la finalidad del experimento, para la amplificación de fragmentos de ADN se emplearon polimerasas termoestables (*BIOTAQ™ DNA polymerase* de Bioline o *Expand High Fidelity PCR System* de Roche), en las condiciones de reacción indicadas en las instrucciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 nM de cada uno de los dos cebadores empleados, la concentración de $MgCl_2$ adecuada, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs y 0.05 U/ μ l de polimerasa. La cantidad de ADN molde empleada fue aproximadamente de 5-20 ng/ μ l de genómico o 1-2 ng/ μ l de plasmídico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 8. Condiciones PCR estándar. T_m es la temperatura de unión de los cebadores al molde y Text el tiempo de extensión de la reacción (1 minuto/kb de amplicón).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	35 s	
Unión del cebador	T_m	35 s	35
Extensión	72°C / 68°C ⁽¹⁾	Text	
Extensión final	72°C / 68°C ⁽¹⁾	7-10 min	1
	16°C	Indefinido	

¹Cuando se empleó la *Expand High Fidelity* y el Text fue mayor a 3 min la temperatura fue 68°C.

4.5.2 Transcripción inversa de ARN (RT-PCR)

A. Eliminación de restos de ADN en muestras de ARN:

En primer lugar, el ARN purificado se trató con el kit *DNase I* de Fermentas que incluye tratamiento con ADNasa durante 30 minutos a 37 °C, a razón de 0.1 μ g/ μ l de ARN y 0.1 U/ μ l de

enzima. Para detener esta reacción se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 minutos, añadiendo EDTA a concentración final 2.5 mM para prevenir la hidrólisis del ARN durante el calentamiento.

B. Síntesis de ADN copia (ADNc):

Para la síntesis de ADN copia, el ARN tratado con ADNasa se sometió a una transcripción inversa usando el kit *M-MLV* (“Moloney Murine Leucemia Virus” Reverse Transcriptase) de Invitrogen. En un volumen final de 40 µl se mezclaron 2 µg de ARN total con 200 pmol de oligo-dT y 0.8 mM de dNTPs y se calentó a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se mantuvo en hielo y se añadieron, 1 x tampón *First Strand Buffer* (kit *M-MLV*, Invitrogen), 4 U/µl del inhibidor de ARNasas *RNasin[®] Plus RNase Inhibitor* (Promega) y 5 mM de Ditiotretitol (DTT) (kit *M-MLV*, Invitrogen). A continuación, se incubó a 37°C durante 2 minutos y, transcurrido ese tiempo, se añadió la transcriptasa inversa (10 U/µl). Se incubó la reacción a 37 °C durante 50 minutos y finalmente se calentó a 70°C durante 15 minutos, para inactivar la enzima.

4.5.3 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La expresión de genes de *F. oxysporum* durante la colonización de plantas de tomate o tras inducción en medios adecuados fue detectada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Para ello, se utilizó como molde el ADNc obtenido a partir de ARN de raíces o tallos de plantas infectadas, o de micelio obtenido tras inducción del hongo con las parejas de oligonucleótidos apropiadas (Tabla 4) y se amplificaron productos entre 160 y 300 pb.

Para cada muestra de ADNc se realizaron tres réplicas técnicas simultáneas. La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Bio-Rad) con un equipo *iCycler iQ real-time PCR System* (Bio-Rad). Por cada reacción se añadieron 7.5 µl de *iQ SyBR Green Supermix* (Bio-Rad), 6.9 µl de ADNc diluido en agua desionizada estéril (1:1) y 300 nM de cada oligonucleótido en un volumen final de 15 µl. Para cada réplica técnica se usaron alícuotas de una misma mezcla. Las condiciones de amplificación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Condiciones de amplificación de la PCR a tiempo real para la cuantificación de expresión génica.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Unión del cebador	62°C	30 segundos	40
Extensión	72°C	45 segundos	
Determinación de fluorescencia	80°C	20 segundos	

Para analizar los productos obtenidos tras la PCR se realizaron las curvas de desnaturalización (curvas de Melting). Para ello se programó el equipo para aumentos de 0.5 °C cada 5 segundos, comenzando a los 55 °C hasta alcanzar los 95 °C, determinándose la fluorescencia tras cada aumento de temperatura.

Los niveles relativos de productos de qRT-PCR se determinaron usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001) (Pfaffil, 2001), siendo los valores C_t normalizados según el valor C_t obtenido para el gen *actina* usado como gen de referencia endógena. Para ello se aplicó la ecuación:

$$\text{Expresión relativa (Re)} = 2^{-(C_{t_{\text{gen}}} - C_{t_{\text{act}}})}$$

En los ensayos de expresión de genes de distintas estirpes la expresión relativa se calculó referida a la expresión observada en la estirpe silvestre mediante la ecuación:

$$\text{Expresión relativa (Re)} = 2^{-[(C_{t_{\text{gen}}} - C_{t_{\text{act}}})_{\text{mutante}} - (C_{t_{\text{gen}}} - C_{t_{\text{act}}})_{\text{silvestre}}]}$$

Como controles negativos se utilizaron plantas no inoculadas y/o reacciones sin ADNc. Los ensayos se repitieron tres veces con replicas biológicas independientes.

4.5.4 PCR de marcaje

Para los análisis de hibridación *Southern* se generaron sondas de ADN marcadas con digoxigenina empleando *DIG DNA Labeling Mix* (Roche), una mezcla que contiene digoxigenina-dUTP y dNTPs. Para obtener una sonda marcada se realizó una PCR estándar en la que se sustituyeron los dNTPs por *DIG DNA Labeling Mix*.

4.5.5 PCR de fusión

Las construcciones utilizadas para la interrupción de genes de *F. oxysporum* se obtuvieron mediante PCRs de fusión, en las cuales se usaron como molde dos fragmentos obtenidos previamente portadores de regiones solapantes, por lo cual no fue necesario el uso de cebadores. El resto de componentes fueron como en una PCR estándar, utilizando siempre *Expand High Fidelity*, aunque en condiciones diferentes a las rutinarias según se detallan en la tabla siguiente:

Tabla 10. Condiciones PCR de fusión. Text es el tiempo de extensión de la reacción (usualmente 1 min/kb del amplicón)

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	45 segundos	
Unión del cebador	60°C	2 minutos	35
Extensión	68°C	Text	
Extensión final	68°C	10 min	1
	16°C	Indefinido	

4.6 Precipitación de ADN

Para eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes de una PCR, o bien, cuando fue necesario concentrar el ADN a un volumen menor se precipita el ADN (fragmentos de PCR o ADNg).

4.6.1 Precipitación rutinaria de ADN

La precipitación rutinaria de ADN se llevó a cabo añadiendo 1:10 parte de una solución 3 M de acetato de sodio y tres volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20°C durante 30 minutos y, se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, se lavó dos veces el sedimento con 70% etanol (v/v) y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

4.6.2 Precipitación de sondas marcadas con digoxigenina

La precipitación de sondas marcadas se realizó añadiendo 10% de una solución 8 M de cloruro de litio (v/v) y 3 volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada.

4.7 Hibridación y detección de ácidos nucleicos

4.7.1 Transferencia y fijación de ADN a membranas de nailon para análisis *Southern*

Para el análisis *Southern*, el ADNg se trató con endonucleasas de restricción y los productos resultantes se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Una vez terminada la electroforesis, se fotografió el gel y se trató para la desnaturalización del ADN y su posterior hibridación. Los tratamientos del gel se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con

agitación suave. Primero se sometió el ADN a una depurinización ácida (hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en 0.25 N HCl durante 15 minutos en dos lavados consecutivos. A continuación, se realizó una desnaturalización alcalina en 0.5 N NaOH:1.5 M NaCl, durante 15 minutos dos veces consecutivas. Finalmente, se neutralizó el ADN sumergiendo el gel en una solución 0.5 M Tris pH 7.5:1.5 M NaCl durante 30 minutos en dos lavados consecutivos. A continuación el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche). La transferencia se llevó a cabo en una bandeja conteniendo tampón 10 x SSC⁽¹⁾ en la que se colocaron, por orden:

- Una bandeja de electroforesis invertida.
- Un papel de filtro doblado 4 veces del tamaño del gel y empapado en solución 10 x SSC. Estas piezas quedaron en contacto con la solución de la bandeja.
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, humedecidas en 10 x SSC.
- El gel de agarosa con las muestras de ADN_g tratado.
- La membrana de nailon.
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, empapadas en 3 x SSC.
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, secas.
- Una pila de unos 10 cm de servilletas de papel.
- Una placa de cristal y un peso aproximado de 0.5 kg.

Todo ello se dispuso con cuidado de eliminar las posibles burbujas de aire que pudieran quedar entre el papel Whatman 3MM y el gel, o entre el gel y la membrana de nailon. La transferencia se prolongó durante al menos 12 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la fijación del ADN a la membrana se realizó a 80 °C durante 90 minutos.

⁽¹⁾**Tampón 10 x SSC:** 1.5 M NaCl y 0.15 M citrato sódico pH 7.0.

4.7.2 Prehibridación e hibridación

Para los análisis *Southern* la membrana con el ADN fijado se prehibridó mediante incubación a 50 °C durante un mínimo de 30 minutos con 0.3 ml/cm² de membrana de tampón *DIG Easy Hyb Granules* (Roche). Para siguiendo las instrucciones del fabricante.

La hibridación se realizó a 50 °C durante 12-14 horas con solución de hibridación⁽¹⁾ a razón de 0.3 ml/cm² de membrana. Previamente la sonda en la solución de hibridación de incubó a 100 °C durante 10 minutos y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 minutos. Tras su uso, tanto la solución de prehibridación como la de hibridación se conservaron a -20 °C para su posterior reutilización hasta un máximo de tres veces.

⁽¹⁾**Solución de hibridación:** Tampón *DIG Easy Hyb Granules* adicionada con 25 ng/ml de sonda bicatenaria marcada con digoxigenina.

4.7.3 Lavados y detección

Una vez retirada la solución de hibridación, los filtros se lavaron dos veces con solución 2 x SSC:0.1% SDS (v/v) a temperatura ambiente durante 5 minutos y con agitación. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 minutos a 50 °C con una solución de 0.5 x SSC:0.1% SDS (v/v) precalentada. Posteriormente se equilibró con tampón 1⁽¹⁾ (0.5 ml/cm² de membrana) a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se bloqueó en tampón 2⁽²⁾ (1 ml/cm² de membrana) a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se incubó con tampón 2 (0.2 ml/cm² de membrana) conteniendo anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (750 U/ml, Roche) diluido 1:20000 a temperatura ambiente durante 30 minutos. La membrana se lavó dos veces consecutivas durante 15 minutos con tampón 1 (1 ml/cm² de membrana) conteniendo 0.3% Tween 20 (v/v) y se equilibró con tampón 3⁽³⁾ (0.2 ml/cm² de membrana) durante 5 minutos.

La detección se llevó a cabo por la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato *CDP-Star*[®] (Roche) que da una señal luminosa detectada por quimioluminiscencia. Para ello, se colocó la membrana sobre una pieza de acetato y se le añadió una solución con *CDP-Star*[®] diluido⁽⁴⁾ (1 ml/100 cm² de membrana). Posteriormente, la membrana se cubrió con otra

pieza de acetato y se retiró el exceso de líquido. Finalmente, se capturó la imagen emitida con la cámara oscura *Fujifilm LAS-3000*.

⁽¹⁾**Tampón 1:** 0.1 M ácido maleico y 0.15 M NaCl pH 7.5

⁽²⁾**Tampón 2:** 1% agente de bloqueo de Roche (p/v) en tampón 1.

⁽³⁾**Tampón 3:** 0.1M Tris-HCl y 0.1 M NaCl pH 9.5.

⁽⁴⁾**Solución CDP-Star[®]:** 1% en tampón 3 (v/v).

4.7.4 Retirada de sonda y rehibridación

Para hibridar la membrana empleada en el análisis *Southern* con una nueva sonda, fue necesario retirar previamente la sonda utilizada. Para ello, siguiendo el manual de uso del sistema *DIG Easy Hyb Granules*, la membrana se lavó dos veces con agua destilada estéril a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se incubó dos veces con una solución 0.2 M NaOH: 0.1% SDS (p/v) a 37 °C durante 10 minutos, con agitación suave. Por último, se lavó dos veces con una solución 2 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras los lavados, la membrana pudo ser utilizada tras prehibridar e hibridar con la nueva sonda.

4.8 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN, SCAI (Universidad de Córdoba, España) usando el *Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un aparato *ABI Prism 377 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA), o en *STABVIDA* (Portugal), tanto de amplicones obtenidos tras PCR como de plásmidos recombinantes.

5. Transformación genética

5.1 Transformación de *E. coli*

Para obtener y transformar células competentes congeladas se siguió el método de Hanahan (1986), con algunas modificaciones.

5.1.1 Obtención de células competentes

Una colonia fresca o 10 μ l de células congeladas en glicerol, de *E. coli* DH5 α se inoculó en 5 ml de PSI-b⁽¹⁾ y se incubó 12 horas a 37 °C con agitación. El cultivo estacionario se transfirió a 100 ml de PSI-b en un matraz de 1 l (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la densidad óptica a 550 nm fue de 0.45-0.5. A continuación, se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 5000 *g*. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 ml de solución Tfb-1⁽²⁾ fría. Después de incubar 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 5000 *g*, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 ml de solución Tfb-2⁽³⁾ fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 minutos, se repartieron en alícuotas de 100 μ l en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

⁽¹⁾**PSI-b:** 5 g/l extracto de levadura; 20 g/l triptona y 5 g/l MgSO₄ x 7H₂O. Ajustar a pH 7.6 con KOH. Esterilizar en autoclave.

⁽²⁾**Solución Tfb-1:** 30 mM acetato potásico pH 6.9; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂ y 15% glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

⁽³⁾**Solución Tfb-2:** 10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl y 15% glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

5.1.2 Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelaron incubando en hielo. A 50 μ l de éstas se les añadió 5 μ l de la solución de ADN y se incubaron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 2 minutos y se dejaron en hielo

durante 5 minutos. Para permitir la expresión del gen que confiere resistencia a ampicilina, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante 15 minutos con 100 µl de medio LB. Por último, se sembró toda la mezcla de transformación en placas de medio selectivo, y se incubaron a 37 °C durante 12-14 horas.

5.2 Transformación de *F. oxysporum*

5.2.1 Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (Powell & Kistler, 1990), con modificaciones. Esporas del hongo congeladas con glicerol se inocularon en 100 ml de medio PDB y se cultivaron 3-5 días a 28°C con agitación. Transcurrido este tiempo se recogieron las nuevas esporas y 5×10^8 se inocularon en 200 ml de medio PDB. Después de 12-14 horas a 28°C, las germínulas obtenidas se recogieron por filtración con un filtro de nailon (Monodur, 10-15 µm) y se lavaron con abundante solución OM⁽¹⁾. A continuación, se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 ml de solución OM conteniendo 0.5% (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (*Glucanex*[®] de Novozymes). El tratamiento enzimático se prolongó durante 45 minutos a 30 °C con agitación muy suave. Transcurrido este tiempo, se comprobó la formación de protoplastos mediante observación microscópica cada 5–10 minutos hasta que el número y la calidad de los protoplastos fueron adecuados. A continuación, se filtró la muestra a través de dos filtros de nailon (Monodur, 10-15 µm) y se lavó con dos volúmenes de solución STC⁽²⁾, manteniendo los tubos en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C y a 1500 g durante 15 minutos para recoger los protoplastos obtenidos. Éstos se resuspendieron suavemente en 1 ml de solución STC y se determinó su concentración, mediante observación al microscopio en una cámara de Thoma. Se repartieron en alícuotas de 100 µl a una concentración de 2×10^7 protoplastos/ml. A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80 °C, después de añadirles 10% de solución PEG⁽³⁾ (v/v) y 1% de DMSO (v/v).

⁽¹⁾**Solución OM:** 1.2 M MgSO₄; 0.1 M Na₂HPO₄, pH 5.8-6.0 ajustado con ácido ortofosfórico. Esterilizar por filtración.

⁽²⁾**Solución STC:** 0.8 M sorbitol; 50 mM CaCl₂ y 50 mM Tris-HCl, pH 7.5.

⁽³⁾**Solución PEG:** 60% polietilenglicol 6000 (p/v) en 0.6 M MOPS.

5.2.2 Transformación de protoplastos

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malardier (Malardier et al, 1989), con algunas modificaciones. Se mezclaron 1-2 µg de ADN transformante con 10 µl de 0,1 M ácido aurintricarboxílico (ATA) (fuerte inhibidor de nucleasas) y se llevaron hasta un volumen final de 60 µl con solución TEC⁽¹⁾. También se preparó un control sin ADN consistente en 10 µl de ATA y 50 µl de solución TEC. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos, al mismo tiempo que los protoplastos obtenidos, ya fueran frescos o congelados a -80°C. Transcurrido ese tiempo, el ADN fue centrifugado 2 minutos a 12000 g y el sobrenadante se mezcló suavemente con los protoplastos y, de nuevo, se incubó en hielo durante 20 minutos. Seguidamente se añadieron 160 µl de PEG (el mismo usado en el apartado 5.2.1) y se prolongó la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de los cuales se añadió 1 ml de solución STC. Se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm para recoger los protoplastos y el pellet se resuspendió en 200 µl de solución STC. Posteriormente se mezclaron alícuotas de 50 µl de protoplastos conteniendo el ADN con 3 ml de agar de cobertera precalentado a 45 °C, y se sembraron en medio mínimo sólido de regeneración. En el caso del control, sin ADN, se realizaron diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en STC, añadiendo 100 µl de cada una a 3 ml de agar de cobertera sembrado en medio mínimo de regeneración, con el fin de obtener placas con distintas concentraciones de protoplastos y determinar el porcentaje de regeneración y su viabilidad. Además, se realizó una dilución 10^{-4} de la solución control en agua desionizada, lo que provoca la desestabilización de los protoplastos y su consiguiente muerte, de la cual 100 µl fueron mezclados con el agar de cobertera, para determinar el porcentaje de esporas presentes. Un último control se realizó mezclando 190 µl de la solución control con 3 ml de agar de cobertera, para certificar la ausencia de crecimiento en medio selectivo. Las placas con medio sólido se incubaron a 28 °C durante un tiempo variable dependiendo del antibiótico de selección, para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina B, se incubaron durante 14 horas, y para la selección con fleomicina, durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 ml de agar de cobertera con el antibiótico de selección, 2 mg de higromicina B o 0.2 mg de fleomicina, excepto en los controles de regeneración y en el control de esporas. Por último, se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias con fenotipo transformante.

Los transformantes obtenidos se transfirieron de manera adecuada a medio selectivo, donde se cultivaron como paso previo a la obtención de colonias puras (originadas a partir de una única espora). Posteriormente, los transformantes obtenidos fueron confirmados mediante amplificación selectiva por PCR y por análisis *Southern*.

⁽¹⁾**Solución TEC:** 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl₂.

5.2.3 Inactivación dirigida de genes

La interrupción de genes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se llevó cabo mediante reemplazamiento génico dirigido usando la técnica *Split Marker* (Catlett et al, 2003). Para ello, en cada transformación se utilizaron dos fragmentos de ADN solapantes (Figura 5A). Uno de los fragmentos contenía la secuencia promotora del gen diana, obtenida tras amplificación mediante PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 4) sobre ADNg del hongo como molde, fusionada al extremo 3' del casete de resistencia usado (higromicina o fleomicina) mediante PCR de fusión (Carroll et al, 1994), también obtenido por PCR a partir de un vector portador de dicho casete. El otro fragmento contenía la región terminadora del gen diana, obtenido por amplificación con oligonucleótidos específicos usando el ADNg del hongo como molde, fusionado al extremo 5' del casete de resistencia. Para ello, los oligonucleótidos del gen diana fueron diseñados con una cola de 30 nucleótidos en el extremo 5' complementarios al extremo 3' o 5' del casete de resistencia, por lo tanto susceptibles de fusionar con dicho casete. Por último, se realizó una nueva amplificación para cada construcción mediante PCR con oligonucleótidos específicos del interior del casete de resistencia y de la región flanqueante del gen diana, de modo que cada construcción era portadora aproximadamente del 75% de cada extremo del casete de resistencia, incluyendo una región idéntica en ambas construcciones, y 1 kb de la región promotora o terminadora del gen diana. Así, la integración del casete parcial de cada construcción no puede conferir resistencia al antibiótico de selección.

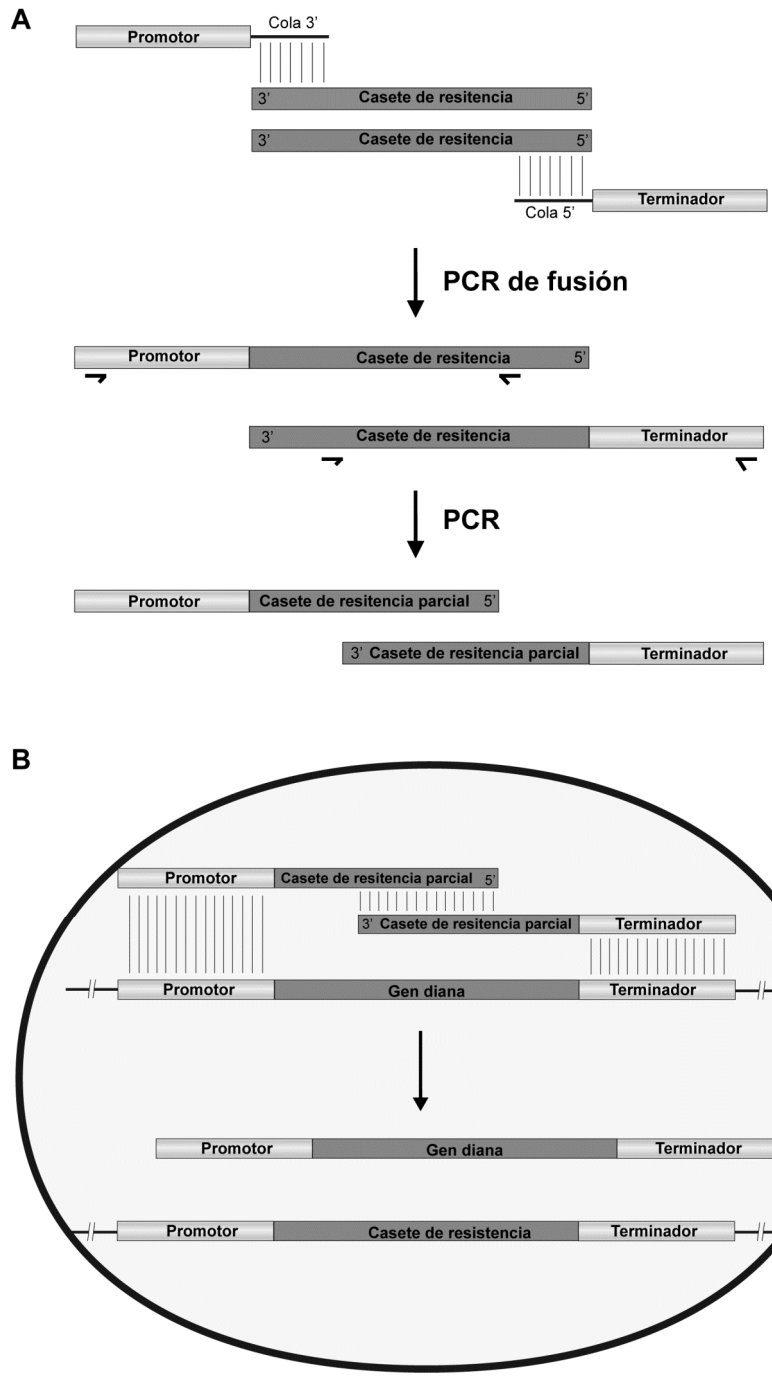


Figura 5. Esquema de interrupción génica mediante la técnica *Split Marker* (Catlett et al, 2003): **A** Obtención de construcciones; **B** Suceso de recombinación doble que se espera que ocurra en el interior del protoplasto de *F. oxysporum*.

Para la obtención de mutantes con alelos delecionados, se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum*, o bien protoplastos procedentes de estirpes mutantes para obtener dobles mutantes, empleando las dos construcciones solapantes obtenidas anteriormente. El hecho de recombinación esperado es la sustitución homóloga del gen diana por el casete de resistencia (Figura 5B). Para ello, las dos construcciones deben recombinar entre sí en el interior del hongo, obteniéndose una única construcción con el casete de resistencia completo y funcional, y a su vez dicha construcción deberá recombinar de manera homóloga en el gen diana, sustituyendo el alelo silvestre por el casete de resistencia. Este mecanismo de doble recombinación reduce, en gran medida, la cantidad de falsos positivos obtenidos por recombinación heteróloga.

5.2.4 Complementación genética de mutantes con genes interrumpidos.

La complementación se llevó a cabo mediante la introducción del alelo silvestre en la estirpe mutante con el alelo interrumpido y un casete de resistencia a un antibiótico tras cotransformación de protoplastos obtenidos a partir de la estirpe mutante. De este modo se espera la integración heteróloga del alelo silvestre. Para ello se amplificaron por PCR el gen diana, incluyendo la región promotora y la terminadora, usando ADN_g de *F. oxysporum* como molde, y el casete de resistencia a partir del vector de clonación adecuado, usando parejas de oligonucleótidos específicos (Tabla 4).

6. Ensayos de infección de plantas de tomate

Para analizar el patotipo de los mutantes de *F. oxysporum* obtenidos en este trabajo, o bien, para determinar la expresión de genes responsables de enzimas fúngicas durante el proceso de infección, se usaron plantas de tomate de la especie *Lycopersicon esculentum* (cv. Money Maker). Las semillas fueron proporcionadas por Syngenta (El Ejido, Almería) y por el Dr. Jesús Cuartero (La Mayora, CSIC, Málaga).

Las plantas fueron cultivadas hasta que presentaron sus primeras hojas verdaderas y, posteriormente, sus raíces se sumergieron en una suspensión conteniendo 5×10^6 esporas

frescas/ml durante 30 minutos. A continuación, se trasplantaron a celdas individuales con vermiculita, para ensayos de infección rutinaria, o bien se mantuvieron en la suspensión de esporas con una leve agitación, para ensayos de expresión en raíces y tallos. En ambos casos se mantuvieron en cámaras de cultivo con condiciones ambientales controladas.

La evolución de la enfermedad se evaluó durante las semanas siguientes a la infección. Para ello se utilizaron los índices de enfermedad descritos por Huertas-González (Huertas-Gonzalez et al, 1999) que corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y pecíolos caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido, y 5, planta muerta (Figura 6). La evolución de la enfermedad también se definió por el porcentaje de supervivencia de las plantas tras 30-40 días usando el método *Kaplan-Meier*, analizando los datos con el programa *GraphPad Prism*, tal y como ha sido descrito por López-Berges (Lopez-Berges et al, 2012). Para los ensayos de expresión de genes, las plantas fueron colectadas a distintos tiempos, recogiendo por separado las raíces y los tallos, que fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.



Figura 6. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Huertas-Gonzalez et al, 1999).

7. Manipulación de muestras proteicas

7.1 Determinación de la cantidad total de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Para ello se mezclaron 5 µl de la muestra proteica con el compuesto *Bio-Rad protein assay* (ácido fosfórico y metanol) en un volumen final de 200 µl en placas microtiter de 96 pocillos. Posteriormente, se determinó la absorbancia de las muestras a 595 nm. La seroalbúmina bovina (BSA) se utilizó como estándar de concentración.

7.2 Isoelectroenfoque preparativo

La separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) se consiguió mediante la técnica de isoelectroenfoque (IEF) preparativo, usando un aparato *Rotofor® Cell System* (Bio-Rad). Se genera un gradiente de pH gracias a la aplicación de un voltaje constante y a la presencia en la solución de anfolitos, moléculas cargadas que ayudan a establecer un gradiente de pH ascendente desde el ánodo hasta el cátodo. Gracias al gradiente de pH generado y al voltaje aplicado por el sistema, las proteínas de la solución migran hasta encontrar su carga neta 0 o, lo que es lo mismo, su pI. Así, las proteínas básicas migran hacia el cátodo y las ácidas hacia el ánodo obteniéndose 20 fracciones con rango de pH ascendente.

De este modo, un volumen total de 55 ml de solución proteica conteniendo un 2% de anfolitos (*Bio-Lyte 3/10 Ampholytes*, Bio-Rad) con rango de pH 3-10 fue sometido al IEF preparativo aplicándose una corriente de 12 W de potencia durante 3-5 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo se recogieron 20 fracciones de 2,5-3 ml cada una. El pH de las fracciones se determinó usando un pHmetro.

7.3 Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas, así como el cálculo de su peso molecular aproximado, se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

(*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis*) (Laemmli, 1970). Las muestras se mezclaron con tampón de carga⁽¹⁾, se hirvieron durante 5 min y se aplicaron en un gel de poliacrilamida (40% *Acrylamide/Bis solution 37.5:1*, Bio-Rad), que constaba de dos fases, un gel superior o gel concentrador⁽²⁾, con una concentración de poliacrilamida de 4%, y un gel inferior o gel separador⁽³⁾ con una concentración de poliacrilamida de 12% o 10%. La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina⁽⁴⁾ a un voltaje constante de 80 V mientras las muestras se introducían en el gel concentrador y después a un voltaje de 130 V en el gel separador, empleando un sistema vertical (*Bio-Rad Miniprotean II*). Los marcadores de peso molecular usados fueron *ProSieve® Quad Color protein marker* (4.6-300KDa).

⁽¹⁾**Tampón de carga:** 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% glicerol (v/v), 1.6% SDS (p/v), 4% β-mercaptoetanol (v/v), 0.1% azul de bromofenol (p/v).

⁽²⁾**Gel concentrador:** 0.25 M Trizma base, 0.2% SDS (p/v), 4% poliacrilamida (v/v), 12 µg/ml Amonio persulfato, 4 µl/ml N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED), pH 6.8.

⁽³⁾**Gel separador:** 0.75 M Trizma base, 0.2% SDS (p/v), 10-12% poliacrilamida (v/v), 12 µg/ml Amonio persulfato, 4 µl/ml TEMED, pH 8.8.

⁽⁴⁾**Tampón Tris-Glicina:** 25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 0.1% SDS (p/v) pH 8.3.

7.4 Tinción con azul de Coomasie

Los geles de proteínas se tiñeron con una solución de colorante azul Coomassie⁽¹⁾, durante 1-14 horas a temperatura ambiente, hasta que las bandas de proteínas fueron claramente visibles. Para desteñir el gel se usó primero una solución de tinción fuerte⁽²⁾ durante 30-60 minutos y posteriormente una solución de tinción débil⁽³⁾ hasta la desaparición completa del color azul de fondo. Posteriormente, se capturó una imagen fotográfica del gel.

⁽¹⁾**Solución azul Coomasie:** 0.125% del colorante Azul Brillante R (p/v) disuelto en una mezcla de 40% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v) en agua destilada.

⁽²⁾**Solución tinción fuerte:** 10% ácido acético (v/v) y 50% metanol (v/v) en agua destilada.

⁽³⁾**Solución tinción débil:** 7% ácido acético (v/v) y 5% metanol (v/v) en agua destilada.

7.5 Precipitación de proteínas con metanol-cloromorfo

Para concentrar y limpiar las muestras proteicas se precipitaron con metanol y cloroformo (Wessel & Flugge, 1984). A cada muestra se le añadió, de forma sucesiva, 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua estéril desionizada, todo ello bien homogenizado. A continuación se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos y se eliminó la fase superior (las proteínas quedan en la interfase como un anillo blanquecino). Posteriormente se añadieron de nuevo 3 volúmenes de metanol y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet, de proteínas, antes de resuspenderlo en agua desionizada estéril.

7.6 Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos de enzimas lipolíticas se obtuvieron a partir de un cultivo con 5×10^8 esporas/ml en 100 ml de PDB a 28 °C con agitación (170 rpm) durante 14 h. Al cabo de ese tiempo las germínulas obtenidas se colectaron por filtración en membrana de nailon (Monodur, 10-15 μm) y se traspasaron para su inducción en medio SM suplementado con 2% de aceite de germen de trigo (WGO), donde se incubaron durante 18-20 horas a 28 °C con agitación. Transcurrido ese tiempo, el cultivo fue filtrado por membrana de nailon y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante obtenido se mantuvo a 4 °C. Y a partir de este punto todos los pasos se realizaron a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a tubos de diálisis de celulosa (diámetro de poro 12 KDa) (Sigma), para ser dializados frente a agua destilada durante 12-14 horas. A continuación, se colocaron las membranas en contacto con polietileno glicol 35000 (PEG, 35k Mr; Fluka Chemika-Biochemika), para la absorción del agua presente en las muestras hasta llevarlas a un volumen final de 2 ml, lo que resultó en un factor de concentración de 50 veces, para el uso del extracto crudo, o hasta unos 55 ml, concentrando 4 veces, para ser sometido a IEF. A todas las muestras se les añadió PMSF (10 $\mu\text{l/ml}$) y cóctel de inhibidor de proteasas (10 $\mu\text{l/ml}$). Cuando fue necesario, se mezclaron las fracciones obtenidas tras IEF de cuatro en cuatro, y se dializaron frente a agua a 4 °C durante 12-14 horas, previa adición de cloruro sódico a una concentración final de 1 M con la finalidad de eliminar los anfolitos usados en el IEF. Posteriormente estas muestras se liofilizaron y resuspendieron en agua. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

8. Ensayos bioquímicos de actividad lipasa

La actividad lipasa se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Winkler y Stuckmann (Winkler & Stuckmann, 1979) con algunas modificaciones. Para este ensayo se utilizó p-nitrofenil palmitato (pNPP, Sigma) como sustrato. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 250 μL , conteniendo: 50 mM tampón Bis-tris-propano pH 8, 0,1% tritón X-100 (v/v), 1% goma arábica, 2 mM pNPP (diluido en isopropanol y homogenizado por sonicación) y 20 μL de extracto proteico como fuente de enzima. La reacción se incubó en placas microtiter de 96 pocillos a 37 °C midiendo la absorbancia a 405 nm de forma periódica en un espectrofotómetro (*SpectraFluor Plus*) hasta la detección de la actividad enzimática, usualmente transcurridos 15-30 minutos.

La actividad lipasa se determinó con relación a una curva estándar de p-nitrofenol y se expresó en μmol o nmol de p-nitrofenol liberado por ml de muestra por minuto. Cada ensayo se realizó al menos 3 veces con 3 replicas biológicas independientes.

9. Detección de la producción de Bikaverina

La fracción lipídica resultante tras cultivar las distintas estirpes mutantes y silvestre en medio SM con 2% de WGO, como única fuente de carbono, durante 18-20 horas a 28°C y en agitación constante, fue separada de los restos del cultivo tras centrifugar 5 minutos a 12000 g y recoger la fracción superior (flotante). Una imagen fotográfica se muestra en la figura 30.

9.1 Determinación de absorbancia

Para una primera aproximación de la producción de Bikaverina, se realizó un barrido de las absorbancias a longitudes de onda entre 200-600 nm de la fracción lipídica de los diferentes mutantes usando un espectrofotómetro NanoDrop®.

9.2 Identificación mediante espectrometría y cromatografía de masas

La identificación de la bikaverina en la fracción lipídica se llevo a cabo mediante espectrometría y cromatografía de masas realizada en la unidad de espectrometría de masas de la Universidad de Córdoba. Las fracciones lipídicas obtenidas se sometieron a una partición mediante tres extracciones consecutivas con acetonitrilo-hexano. Las fracciones de acetonitrilo fueron concentradas hasta 2 ml, a continuación separadas por extracción de la fase sólida mediante columnas de Florisil (1g) para eliminar los residuos oleosos de las muestras y eluidos con 15 ml de acetonitrilo. Por último, las muestras se secaron en un rotovapor, se reconstituyeron con 1 ml de metanol y se sometieron a espectrometría de alto rendimiento por cromatografía líquida de masas (MS) mediante ionización positiva por electroespray (*HPLC/MS Varian 1200L Triple Quadrupole*). Para una identificación exacta, una solución de Bikaverina purificada, cedida generosamente por el Dr. Javier Avalos (Universidad de Sevilla) fue usada como referencia. Los iones formados en la ionización fueron detectados mediante un escáner de masas iónicas desde m/z 150 a m/z 800 (1 s/scan). La cromatografía líquida se llevó a cabo usando una columna de fase inversa C18 (15 cm x 0,21 mm ID) a una temperatura de 35 °C. Las fases móviles usadas fueron agua/ácido fórmico (0,1%) y metanol en gradiente.

10. Análisis informáticos

10.1 Búsqueda BLAST

Las búsquedas *in silico* de genes, tanto de *F. oxysporum* como de otras especies fúngicas, se realizaron usando el algoritmo *BLAST* (Altschul et al, 1990) alojado en las páginas webs correspondientes al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o al *Broad Institute Fusarium Comparative Database* (<http://www.broadinstitute.org>).

10.2 Alineamientos

Las secuencias de aminoácidos deducidas de distintos genes de *F. oxysporum* y de otras especies fúngicas cercanas fueron alineados usando el algoritmo *CLUSTALW* (Thompson et al, 1994) y el programa informático *Bioedit v7.0.0* (Hall, 1999).

10.3 Árboles filogenéticos

Para la obtención de árboles filogenéticos, los alineamientos de secuencias de aminoácidos, obtenidos previamente, fueron desprovistos de los huecos existentes mediante el programa *GBlocks v0.91b* (Castresana, 2000). A continuación, aplicando el programa *PHYLM v3.0* (Guindon & Gascuel, 2003) se realizó un análisis filogenético con un “bootstrap” no paramétrico de 1000 repeticiones a partir del alineamiento resultante, usando el modelo de sustitución más adecuado. Dicho modelo viene determinado tras la optimización realizada por el programa *MODELGENERATOR v0.85* (Keane et al, 2006). La relación filogenética obtenida se representó mediante un cladograma construido con el programa *MEGA v4* (Tamura et al, 2007).

10.4 Cálculos teóricos sobre proteínas deducidas

El peso molecular y el pI teórico de las distintas proteínas analizadas en esta tesis se calculó mediante la aplicación alojada en la web (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html). El peso molecular viene dado según los pesos atómicos estándar de acuerdo a la IUPAC (1997), asumiendo un pH de 7. El pI se calculó mediante el programa *ExPASy's Compute pI/Mw* (Gasteiger et al., 1993).

El péptido señal teórico se obtuvo mediante el programa *SignalP v4.0* (Nordahl et al., 2011) alojado en la página web (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

CAPÍTULO 1

Perfil de enzimas lipolíticas: papel durante el desarrollo de la enfermedad vascular en tomate

1. Introducción

1.1. Lipasas

1.1.1. Mirada histórica y definición

Las lipasas se describieron en 1856 por Claude Bernard al descubrir una lipasa en el jugo pancreático. En los años 1950 se realizaron los primeros trabajos en hongos, encontrándose lipasas en especies de los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Humicola* (Brockhoff & Jensen, 1974; Lawrence, 1967). En 1958, se definieron las lipasas en términos cinéticos, basándose en el fenómeno de activación interfacial, por el cual, estas enzimas solo se activarían en presencia de una interfase lípido-agua (Sarda & Desnuelle, 1958). En 1990 dos lipasas fueron analizadas mediante rayos X, revelando que la activación interfacial se debía a una estructura que cubría el sitio activo capaz de desplazarse en presencia de la interfase (Brady et al, 1990; Winkler et al, 1990) (Figura 7).

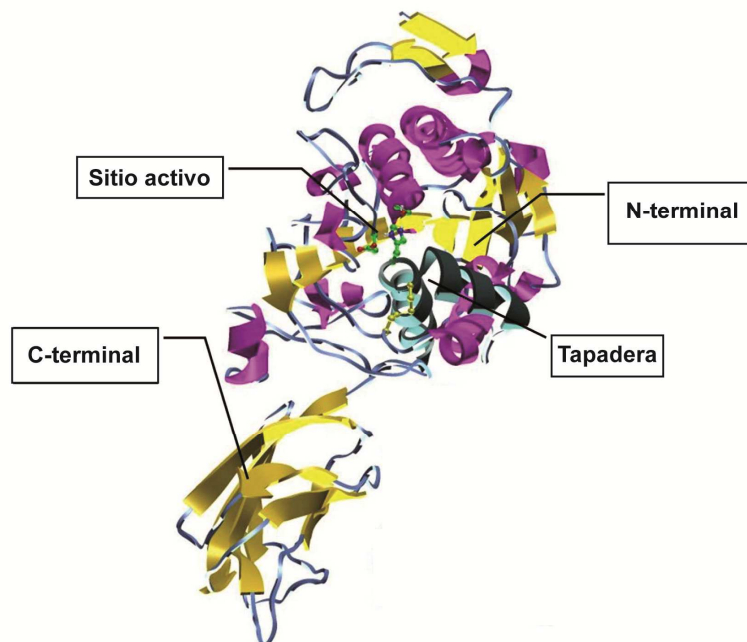


Figura 7. Estructura tridimensional de la lipasa pancreática humana

Actualmente, las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) se definen como enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos insolubles de cadena media o larga y otros ésteres o ácidos grasos insolubles en agua. La hidrólisis de triglicéridos da lugar a diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol (Figura 8).

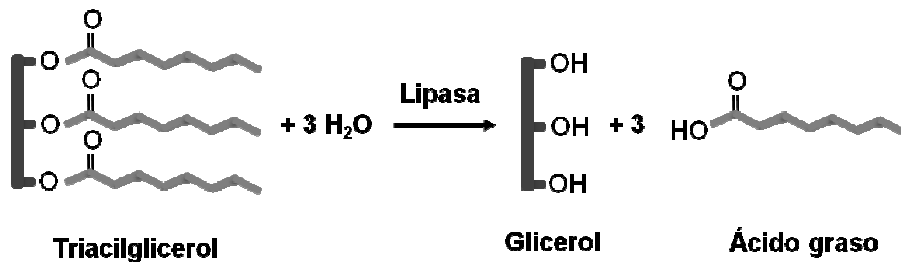


Figura 8. Hidrólisis de triacilglicéridos llevada a cabo por lipasas

1.1.2. Estructura y mecanismo de acción

Estructuralmente, las lipasas se caracterizan por una estructura α/β -hidrolasa plegada, una triada catalítica consistente en serina - ácido aspártico o glutámico - histidina, incluyéndose la serina en un pentapéptido altamente conservado con la secuencia GxSxG (x=cualquier nucleótido) que forma parte del denominado codo nucleofílico, y una estructura móvil, denominada tapadera, cuyo desplazamiento es necesario para la conformación activa de la enzima (Cambillau & van Tilbeurgh, 1993; Lowe, 1992; Nardini & Dijkstra, 1999; Pleiss et al, 1998; Pleiss et al, 2000; Winkler et al, 1990).

La estructura α/β -hidrolasa plegada consiste en un centro hidrofóbico constituido por ocho láminas β empaquetadas entre dos capas formadas por hasta seis hélices α anfipáticas. La acción catalítica reside en la triada serina-ácido-histidina, altamente conservada, cuyos residuos forman una geometría determinada (Figura 9). La serina, se localiza en el codo nucleofílico tras la quinta lámina, el ácido tras la séptima y la histidina tras la octava. Para el reconocimiento del sustrato tan son esenciales cinco láminas β paralelas, el orden de la triada catalítica y el codo nucleofílico en la quinta lámina (Cousin et al, 1998). La hidrólisis del éster por la α/β -hidrolasa consiste en cinco pasos básicos (Cygler et al, 1994): la unión del sustrato; el ataque nucleofílico sobre el enlace éster del carboxilo, llevado a cabo por la serina y mediado por el ácido y la

histidina de la triada catalítica; la estabilización del intermediario formado por la acción del denominado hueco oxianión, formado por dos amidas (Pleiss et al, 2000); la liberación de un alcohol formando un complejo acil-lipasa; y su hidrólisis, liberándose un ácido graso y regenerándose la enzima. La tapadera móvil, característica de lipasas, consta de dos hélices α cortas y se encuentra cubriendo el sitio catalítico en la forma inactiva. Su desplazamiento, asociado a la presencia de una interfase lípido-agua, activa la enzima al dejar accesible el sitio catalítico (Nardini & Dijkstra, 1999).

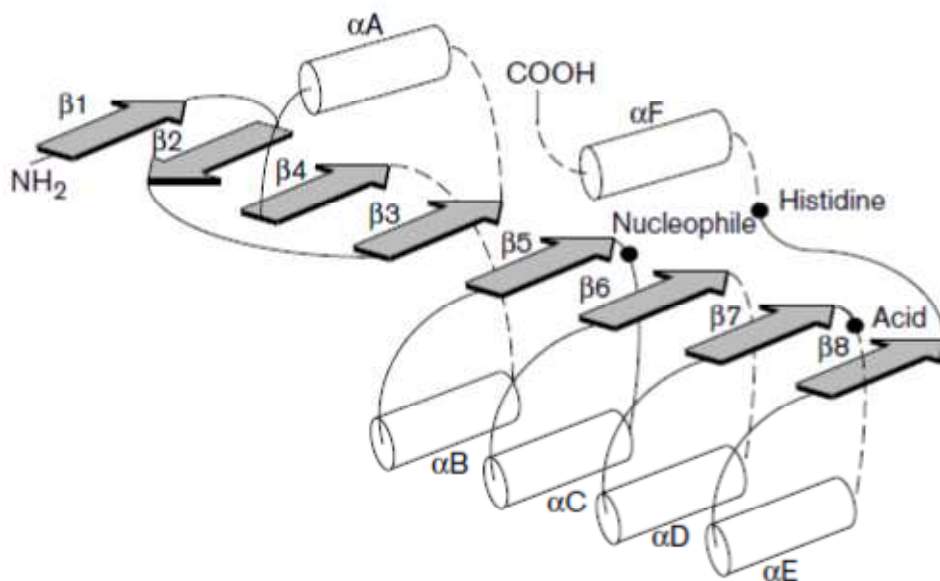


Figura 9. Esquema de la estructura secundaria de la α/β -hidrolasa plegada. Las hélices α y las láminas β están representadas por cilindros blancos y flechas grises, respectivamente. La localización de la triada catalítica está indicada por puntos negros (Nardini & Dijkstra, 1999).

1.1.3. Aplicaciones y funciones de lipasas

Aplicaciones industriales

Las lipasas son enzimas de gran interés debido a su termoestabilidad, su especificidad de sustrato, su actividad sobre solventes orgánicos, su quimioselectividad y estereoselectividad, y por su independencia de cofactores para la reacción catalítica. Además, son fáciles de extraer

en grandes cantidades, especialmente a partir de formas biológicas. La estructura cristalográfica de muchas lipasas es conocida, lo que facilita su diseño sintético mediante ingeniería química. (Hasan et al, 2006; Jaeger & Eggert, 2002; Jaeger & Reetz, 1998). Por ello, constituyen el tercer grupo de enzimas industriales, ofreciendo aplicaciones en alimentación, farmacéutica, producción de cosméticos, compuestos agroquímicos, producción de detergentes, tratamiento de residuos, producción de celulosa y papel, procesos de química orgánica, industria textil o incluso como herramienta diagnóstica (Ghosh et al, 1996; Hasan et al, 2006; Jaeger et al, 1999; Jaeger & Eggert, 2002; Jaeger & Reetz, 1998).

Funciones biológicas

Para determinar las funciones de las lipasas es necesario conocer el sustrato que degradan, es decir, los lípidos. Los lípidos se definen como moléculas biológicas solubles en solventes orgánicos con propiedades hidrofóbicas o anfipáticas. Clásicamente, las funciones de los lípidos se reducen a su papel estructural en membranas biológicas y como reserva de energía. No obstante, durante los últimos 20 años se han descubierto nuevas funciones, lo que explica que existan en la naturaleza miles de tipos diferentes.

Así, se han descrito funciones tan diversas como ser moléculas de señalización en procesos fisiopatológicos; estar implicados en el transporte intracelular y en la transcripción génica; o regular procesos como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular (Dickson & Lester, 2002; Shea & Del Poeta, 2006; Singh & Del Poeta, 2011). Algunos productos de la hidrólisis de triacilglicéridos, como el diacilglicerol o los ácidos grasos, pueden actuar como mensajeros secundarios en diversos procesos (Stehr et al, 2003; Takai et al, 1979). Los lípidos de membrana, especialmente esfingolípidos o fosfolípidos, participan en procesos celulares como endocitosis, señalización, tráfico de membrana intracelular u organización de membranas mediante interacciones con proteínas (Laxalt & Munnik, 2002; van der Meer-Janssen et al, 2010). En plantas, la movilización de triacilgliceroles en los aceites de semillas, es básica para su crecimiento temprano. Se ha descrito la partición de lípidos en rutas de señalización durante la respuesta de plantas al estrés tanto abiótico, como biótico, y su implicación en la activación de los sistemas de defensa (Lessire et al, 2009). Incluso se han encontrado ácidos grasos, como el ácido láurico, con efecto antifúngico reduciendo el crecimiento y la germinación de esporas en varias especies de hongos (Walters et al, 2003).

Una de las funciones más destacables de los lípidos es la formación de la cutícula de la planta, que está compuesta principalmente por un polímero de ácido graso esterificado a moléculas de glicerol denominado cutina. Dicho polímero se encuentra impregnado en mayor o menor cantidad por ceras, que son una mezcla heterogénea de ácidos grasos de cadena larga (Heredia, 2003; Lessire et al, 2009; Li et al, 2002).

Mención especial merecen las oxilipinas, compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) enzimática o no enzimáticamente oxigenados, con importantes funciones en plantas y hongos. La señalización por oxilipinas es la ruta de señalización mejor conocida en respuesta al estrés mediada por lípidos y que facilita la resistencia frente a patógenos fúngicos. Cada año se descubren nuevos metabolitos como posibles dianas de oxilipinas (Christensen & Kolomiets, 2011). En plantas se han descrito 150 oxilipinas, siendo el ácido jasmónico (JA) el más estudiado (Mosblech et al, 2009). En hongos se ha descrito que las oxilipinas regulan la producción de metabolitos secundarios e intervienen en el desarrollo: crecimiento celular, diferenciación de esporas, apoptosis, control de la morfogénesis, formación de biofilms y patogenicidad (Christensen & Kolomiets, 2011; La Camera et al, 2004; Noverr et al, 2003; Singh & Del Poeta, 2011). Evidencias recientes muestran que algunos géneros de hongos patógenos utilizan las oxilipinas producidas por la planta en respuesta al ataque, para su propia proliferación debido a similitudes estructurales (Brodhagen et al, 2008; Tsitsigiannis & Keller, 2007).

La variedad de lípidos presentes en eucariotas y el amplio abanico de funciones los hacen una atractiva diana para los patógenos (van der Meer-Janssen et al, 2010). El ataque se lleva a cabo por lipasas que catalizan la hidrólisis del enlace éster característico de estas moléculas. De este modo, las lipasas han emergido como candidatas a factores de virulencia de especies patógenas. Las lipasas pueden resultar esenciales en la penetración a través de la cutícula (Kolattukudy et al, 1995); provocan la desestabilización de las membranas celulares; modifican las rutas de señalización y procesos celulares en los que intervienen lípidos, como el desarrollo, la defensa frente a patógenos u otros procesos celulares básicos; e incluso modifican el metabolismo del hospedador e inducir la producción de moléculas necesarias para el desarrollo y el progreso de la infección, como las oxilipinas y los esfingolípidos (Christensen & Kolomiets, 2011).

Lipasas en hongos patógenos

Se han descrito varias lipasas de hongos patógenos que intervienen de forma determinante durante la patogénesis. La primera evidencia de lipasas fúngicas involucrada en la infección se encontró en el patógeno humano *Candida albicans* (Ibrahim et al, 1995). Por otro lado un mutante de *Candida parapsilosis* deficiente en dos lipasas con una reducción drástica en esta actividad y en el crecimiento en aceites como fuente de carbono, estando afectado en la virulencia sobre ratones y siendo fácilmente eliminado por macrófagos (Gacser et al, 2007a; Gacser et al, 2007b).

En especies patógenas de plantas se han descrito ejemplos de lipasas involucradas en el proceso de infección. En *Alternaria brassicicola* se determinó la presencia de una lipasa durante los estadios tempranos de la patogénesis; además, la adición de anticuerpos antilipasas conllevó una reducción del 90 % en las lesiones en hojas de coliflor, pero esto no ocurre en hojas en las que previamente se había eliminado la cera de la superficie, sugiriendo la relación de estas lipasas con la degradación de la pared celular vegetal (Berto et al., 1997; Berto et al., 1999). Resultados similares se observaron en *Botrytis cinerea* donde una lipasa se expresa durante las fases tempranas de la infección y, Así mismo, la aplicación de anticuerpos antilipasa provocó una disminución de las lesiones en hojas de tomate, mostrando su importancia en la penetración (Commenil et al, 1999; Commenil et al, 1998). Por el contrario, en este mismo hongo, la disrupción génica de una lipasa no parecía afectar la penetración del hongo (Reis et al, 2005). En *Ustilago maydis*, la presencia de lípidos en el medio provoca el cambio de conformación de levadura, no patógena, a células filamentosas capaces de colonizar la planta de maíz, lo que indica que la respuesta a lípidos es un componente importante del proceso de infección (Klose et al, 2004). La patogénesis de *Burkholderia glumae* está regulada por el denominado quórum sensing (intra- e inter-comunicación que regula el crecimiento, metabolismo y virulencia), estando la lipasa LipA activamente involucrada. Mutantes en este gen se ven afectados en su virulencia (Devescovi et al, 2007). En algunos casos las lipasas se han asociado al desarrollo del apresorio, como en *Blumeria graminis* donde un gen lipasa es de los más expresados durante la germinación y formación del apresorio (Thomas et al, 2002)(Thomas et al., 2002), o en *Magnaporthe grisea*, donde la actividad lipasa aumenta durante la formación del apresorio (Thines et al., 2000).

Dentro del género *Fusarium*, estudios en *F. solani* (Nasser Eddine et al, 2001) y en *F. oxysporum* (Martinez-Rocha et al, 2008) han mostrado la presencia de actividad lipasa y la

expresión de genes lipasas durante la infección de plantas. Por su parte, en *F. graminearum* se han identificado varias lipasas (Fgl1-Fgl5) expresadas en presencia de lípidos y durante la infección de la planta. Mutantes en los genes *fgl1*, *fgl2* y *fgl5* mostraron defectos para desarrollar la infección, pero no así el resto. Fgl1 parece tener importancia en las etapas tardías de la infección, ya que el mutante no era capaz de superar los cambios sufridos en la pared de las células cercanas al punto de infección (Nguyen et al, 2010; Voigt et al, 2005). Al igual que Fgl3 y Fgl4, otra lipasa identificada en este hongo (Lip1), que también se expresaba durante la infección y en presencia de ácidos grasos, no mostró ser indispensable para la infección, pese a que el mutante mostraba actividad reducida (Feng et al, 2005). Estas lipasas mostraron diferente especificidad de sustrato sugiriendo un papel diferencial durante la adquisición de nutrientes o la infección del hongo. Otra lipasa de *F. graminearum*, FgATG15, se ha relacionado con la autofagia celular y su delección causaba defectos en la formación de las conidias, la germinación, el crecimiento, la formación de hifas aéreas y en su capacidad infectiva (Nguyen et al, 2011).

Estos resultados muestran la implicación de lipasas de hongos patógenos durante la infección. Sin embargo, hasta el momento existen escasas evidencias de la importancia de estas enzimas en patógenos de suelo.

1.2. Regulación transcripcional de lipasas

1.2.1. Reguladores de utilización de ácidos grasos en hongos

En *Aspergillus nidulans* se han identificado dos factores de transcripción tipo dedos de zinc binuclear o $Zn(II)_2Cys_6$, FarA y FarB, cuya inactivación mediante mutación resulta en una disminución de la capacidad de usar ácidos grasos como fuente de carbono. Mutantes en *farB* mostraron incapacidad para la utilización de ácidos grasos de cadena corta aunque no en aquellos de cadena larga. La delección de *farA* resultó en pérdida de la capacidad de utilizar ácidos grasos de cadena corta, y en aquellos que contienen entre 10 y 22 carbonos (Hynes et al, 2006). Previamente, se habían descrito en el hongo *F. solani* dos proteínas $Zn(II)_2Cys_6$, CTF1 α y CTF1 β , capaces de regular diferentes cutinasas, que resultaron ser ortólogos a los de *A. nidulans* (Li & Kolattukudy, 1997; Li et al, 2002). Otros reguladores, ortólogos a los anteriores, se han descrito en *Yarrowia lipolytica* (Poopanitpan et al, 2010) y en *C. albicans* (Ramirez & Lorenz, 2009), denominados Por1p y Ctf1p, respectivamente, interviene en la utilización de ácidos grasos, y en *C. albicans* también está involucrado en virulencia. El factor de transcripción Ctf1

identificado en *F. oxysporum* resultó ser un regulador de una cutinasa y una lipasa (Martinez-Rocha et al, 2008). Estos descubrimientos unidos al hecho de que en ascomicetos filamentosos todos estas proteínas $Zn(II)_2Cys_6$ están extraordinariamente conservadas (Hynes et al, 2006) indica que estas proteínas regulan el mecanismo necesario para utilizar ácidos grasos como fuente de carbono, posiblemente mediante la regulación de enzimas capaces de degradar el enlace éster de dichos ácidos grasos, entre ellas las lipasas.

1.2.2. Factores de transcripción con dominio $Zn(II)_2Cys_6$

La mayoría de proteínas que contienen zinc son reguladores capaces de unirse al ADN y se denominan proteínas con dedos de zinc. Estas se agrupan en tres clases basándose en la secuencia de aminoácidos, altamente conservada, que poseen en la región de unión al ADN: clase I, clase II y clase III (MacPherson et al, 2006), siendo las de clase III exclusivas de hongos.

Estructura de factores de transcripción con dedos de zinc clase III o $Zn(II)_2Cys_6$

Las proteínas con dedos zinc clase III se caracterizan por contener un dominio de unión al ADN con el motivo conservado $CX_2CX_6CX_nCX_2CX_{6-8}C$, donde los residuos de cisteína se unen a dos átomos de zinc, que coordinan el plegamiento para su unión al ADN, por lo que se denominan con dedos de zinc binucleares o $Zn(II)_2Cys_6$. La interacción con el ADN se realiza mediante la formación de monómeros, homodímeros o heterodímeros (MacPherson et al, 2006).

Dentro de esta clase, el mejor estudiado es el factor de transcripción Gal4p de *Saccharomyces cerevisiae* (Marmorstein et al, 1992; Pan & Coleman, 1990). En estas proteínas el dominio de unión a ADN se comprende de tres regiones (MacPherson et al, 2006): la estructura dedo de zinc, una región de unión o "linker" y una región dimerizadora. El dedo de zinc se localiza en el extremo amino y está constituido por dos hélices α cortas con tres residuos de cisteína cada una ($CX_2CX_6C / CX_2CX_{6-8}C$) que rodean a un átomo de zinc. Cada hélice α está flanqueada a ambos lados por un aminoácido básico y están separadas entre sí por un bucle asociado a un residuo de prolina que confiere flexibilidad (Todd & Andrianopoulos, 1997). Las seis cisteínas y la prolina son esenciales para su funcionamiento, al igual que una lisina (que puede ser sustituida por arginina, histidina o glutamina) altamente conservada localizada entre la segunda y la tercera cisteína. A continuación del motivo dedo de zinc se sitúa el "linker" que está

constituido por secuencias muy diferentes según las distintas proteínas. La intervención de esta región en la unión al ADN podría explicar la variabilidad de especificidad. La denominada región dimerizadora generalmente se posiciona a continuación del linker. Esta región adquiere una estructura de hélice superenrollada responsable de la dimerización y de las interacciones con otras proteínas (MacPherson et al, 2006; Schjerling & Holmberg, 1996).

Estas proteínas contienen en la zona intermedia una región de poca homología (MHR), la cual separa al dominio de unión de la región C-terminal caracterizada por ser ácida y que actúa como un activador. Dicha región ácida está poco conservada y su estructura y función no está bien definida. El MHR y la región ácida podrían interactuar directa o indirectamente para regular la activación de la proteína (MacPherson et al, 2006) (Figura 10).

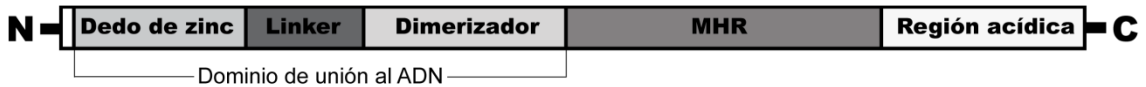


Figura 10. Esquema de proteínas dedos de zinc (MacPherson et al, 2006)

Secuencias de ADN reconocidas por proteínas $Zn(II)_2Cys_6$

Muchos estudios muestran que las proteínas $Zn(II)_2Cys_6$ reconocen elementos que contienen dos secuencias de tres nucleótidos, normalmente en una configuración simétrica y separadas por una secuencia de longitud variable. Los factores de transcripción CTF1 α y CTF1 β de *F. solani* se unen al palíndromo GCC(N)GGC, mientras que FarA y FarB de *A. nidulans* reconocen la secuencia CCGAGG (o su complementaria, CCTCGG), que también forma parte del palíndromo en las regiones reconocidas por CTF1 α y CTF1 β de *F. solani* (Hynes et al, 2006; Li & Kolattukudy, 1997; Li et al, 2002). En *S. cerevisiae* se ha descrito que los factores de transcripción $Zn(II)_2Cys_6$ GAL4 y PPR1 también se unen a tripletes conservados del tipo CGG(N)CCG en los promotores regulados (Liang et al, 1996). La simetría de los sitios de reconocimiento coincide con que estas proteínas actuarían formando dímeros. Los tripletes CGG son los más comunes, aunque se han descrito variaciones de este elemento, como por ejemplo GGR (R es purina), TTA, TCC o GCC. Dichos tripletes simétricos se encuentran como palíndromos (CGG_CCG, también llamadas repeticiones invertidas), como repeticiones directas

(CGG_CGG), o en repeticiones evertidas (CCG_CGG) (Schjerling & Holmberg, 1996; Todd & Andrianopoulos, 1997).

Modelo de acción de proteínas Zn(II)₂Cys₆

Se ha propuesto un modelo de acción para proteínas tipo Zn(II)₂Cys₆, que postula que los dímeros se unen a las secuencias de tres nucleótidos simétricas, siendo la orientación de los tripletes, el espacio entre ellos, la influencia de la región MHR y la distancia hasta la hélice superenrollada los que determinan la especificidad de unión (Schjerling & Holmberg, 1996) (Figura 11). Otros factores como su grado de fosforilación juegan un papel importante en su localización nuclear (Jans, 1995) unión al DNA y su activación (Hill & Treisman, 1995).

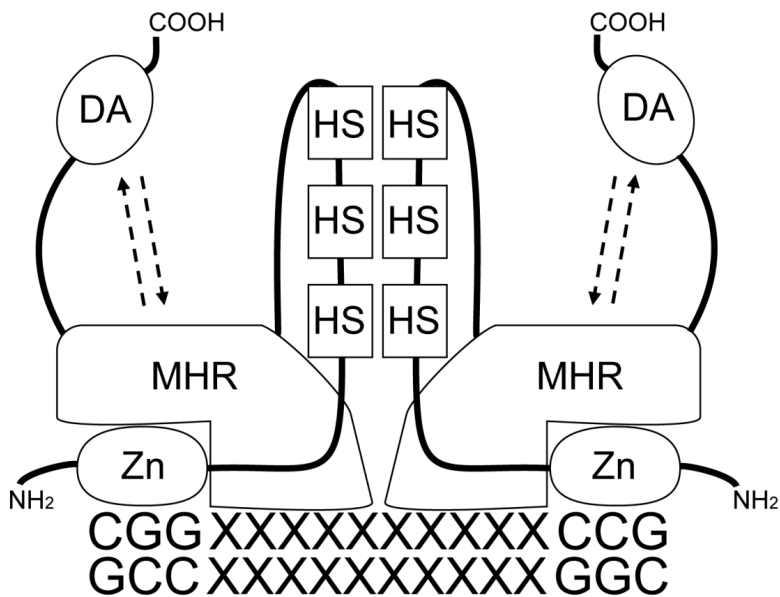


Figura 11. Modelo propuesto para las proteínas con motivo de unión al DNA del tipo Zn(II)₂Cys₆. El motivo de unión al DNA (Zn) reconoce los tripletes CGGX_NCCG: el espacio entre los tripletes (X_N) está determinado por la distancia de unión hacia las hélices superenrolladas (HS) que forman el homodímero. La MHR interactúa con la región de reconocimiento del motivo de unión al DNA y con el dominio de activación (DA) (Schjerling & Holmberg, 1996).

1.3. Bikaverina

La bikaverina es un pigmento de color rojizo que se sintetizan a partir de polikétidos, que constituyen el grupo más diverso de metabolitos secundarios en *Fusarium* (McInnes et al, 1976). Los pigmentos ofrecen protección frente al estrés ambiental como la exposición a luz UV o la oxidación, mientras que otros podrían contribuir a la virulencia. La bikaverina se ha descrito como una micotoxina efectiva frente a protozoos, nematodos y hongos filamentosos, incluso se ha descrito como agente antitumoral (Limon et al, 2010; Son et al, 2008).

La bikaverina se sintetiza a partir del ácido orselínico y contiene nueve unidades de acetato formando un anillo de benzoxanteno. Suele estar presente junto a otra molécula similar denominada norbikaverina, menos metilada, y que probablemente le preceda en la ruta de biosíntesis (Limon et al, 2010) (Figura 12). El gen que sintetiza el precursor de la bikaverina (*bik1*) se localiza junto a otros cinco genes que también intervienen en su regulación y síntesis (*bik2-bik6*) (Figura 12B), entre los que se encuentran una monooxigenasa dependiente de FAD (*bik2*), una O-metiltransferasa (*bik3*), un factor transcripcional tipo NmrA (*bik4*), otro factor transcripcional tipo Zn(II)₂Cys₆ (*bik5*) y un transportador tipo MFS (*bik6*) (Wiemann et al, 2009).

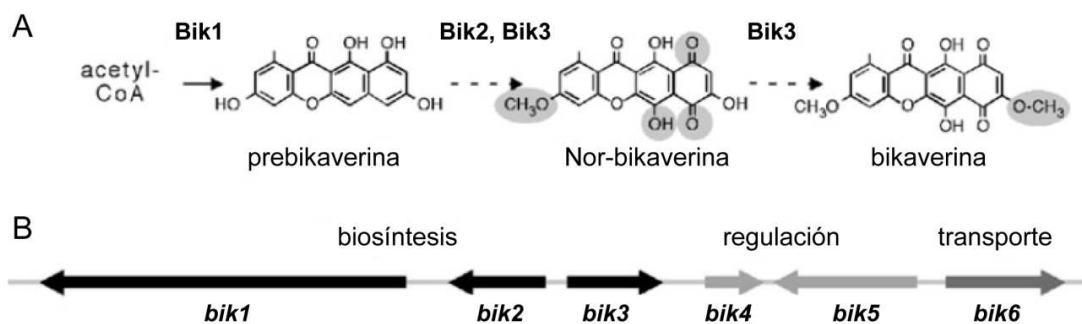


Figura 12. Biosíntesis de la bikaverina. **A** Compuestos identificados en la ruta de la bikaverina y orden hipotético de las reacciones. Las áreas sombreadas muestran grupos químicos añadidos a la molécula en cada paso. Las flechas discontinuas indican los pasos supuestos. **B** Grupo de genes que intervienen en la producción de la bikaverina. Las flechas en negro indican los genes relacionados con biosíntesis; las flechas en gris indican los genes reguladores; y las flechas gris oscuro indican el gen del transportador (Limon et al, 2010).

La producción de bikaverina está regulada por mecanismos muy diversos: presencia o ausencia de nitrógeno, fosfato, sulfato, calcio o sacarosa; pH del medio (via PacC); una aireación

apropiada; además puede estar regulada por otras rutas como por ejemplo *gac1* de *F. verticillioides* o el gen de una adenilil ciclasa, *fpacy1* de *F. proliferatum* (Limon et al, 2010).

1.4. En este estudio

En el presente estudio se ha analizado el papel del sistema lipolítico del hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* durante el desarrollo de la patogénesis. Para ello se presenta una amplia caracterización genética y bioquímica del perfil de lipasas identificadas en dicho hongo, mediante la disrupción génica y análisis de actividad enzimática, aportando evidencias de la necesidad de la degradación de compuestos lipídicos para el desarrollo completo de la infección en plantas de tomate.

2. Resultados

2.1. Identificación *in silico* y caracterización del sistema lipolítico de *F. oxysporum*

2.1.1. Búsqueda *in silico* de genes lipasas, estructurales y reguladores, en el genoma de *F. oxysporum*

Para identificar los genes responsables de lipasas extracelulares, así como sus reguladores, en el hongo patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se ha *in silico* analizado su genoma con la información disponible en (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/) usando el algoritmo *BLASTp*. Como punto de partida se han usado las secuencias de aminoácidos deducidos de lipasas estructurales (*FGL1-FGL5*) identificadas en *F. graminearum* (Nguyen et al, 2010; Voigt et al, 2005) y de los reguladores *ctf1a* y *ctfβ* descritos en *F. solani* (Li & Kolattukudy, 1997; Li et al, 2002).

Para lipasas extracelulares, solo se han considerado aquellas proteínas cuya identidad venía determinada por un valor esperado inferior a e^{-23} . Entre estas, se seleccionaron las que contenían el pentapéptido Glicina-X-Serina-X-Glicina (GX SXG, siendo X cualquier aminoácido) altamente conservado en lipasas fúngicas, donde la Serina forma parte de la triada (Ser-Asp/Glu-

His) que constituye el sitio catalítico (Nardini & Dijkstra, 1999), y se descartaron las que no presentaban péptido señal. Tras la búsqueda realizada, se seleccionaron 25 genes correspondientes para supuestas lipasas extracelulares, que se han denominado: *lip1*, previamente identificado por (Martinez-Rocha et al, 2008), *lip1.2*, *lip2*, *lip3*, *lip4*, *lip5*, *lip6*, *lip7*, *lip8*, *lip9*, *lip10*, *lip11*, *lip12*, *lip13*, *lip14*, *lip15*, *lip16*, *lip17*, *lip18*, *lip19*, *lip20*, *lip21*, *lip22*, *lip23* y *lip24*.

En el caso de genes reguladores, se encontraron dos proteínas muy similares a los reguladores de *F. solani*, con elevada identidad con *farA* y *farB* de *Aspergillus nidulans*, descritos como reguladores de lipasas (Hynes et al, 2006). Dichos genes se han denominado *ctf1* (Martinez-Rocha et al, 2008) y *ctf2*, ambos con características de factores de transcripción como: señal de localización nuclear (NLS) deducida a partir del algoritmo de identificación alojado en *cNLS Mapper* (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) (Kosugi et al., 2009); y un dominio de unión al ADN de tipo Zn(II)₂Cys₆ que sigue el patrón CX₂CX₆CX₇₋₉CX₂CX₆C (siendo X cualquier nucleótido) (Li & Kolattukudy, 1997; Li et al, 2002).

Las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes seleccionados, se compararon con ortólogos de especies fúngicas relacionadas mediante el algoritmo *BLASTp* usando la información disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, tras lo cual se anotaron manualmente algunas secuencias lipasas (Tabla 11). Además, en el caso de *lip1*, *lip2*, *lip5*, *ctf1* y *ctf2* se confirmaron mediante secuenciación del ADNc del hongo cultivado en medio de inducción. Para ello, el ADNc amplificado con cebadores específicos de la ORF de cada gen se clonó en un plásmido adecuado y se transformó en *E. coli*.

Tabla 11. Modificaciones tras la anotación manual realizada sobre las secuencias de genes lipasas con respecto a la anotada en la base de datos del genoma de *F. oxysporum*.

Gen	Proteína original (aa)	Proteína modificada (aa)	Modificación realizada
<i>lip2</i>	222	406	La fase abierta de lectura se extiende 552 nucleótidos sobre la secuencia anotada
<i>lip7</i>	524	538	Se elimina el segundo intrón
<i>lip15</i>	430	541	Reducción del primer intrón; parte del cuarto intrón anotado pasa a ser región codificante y se genera un quinto intrón
<i>lip19</i>	452	491	Reducción del segundo intrón; parte del tercer intrón anotado pasa a ser región codificante y se genera un cuarto intrón

La tabla 12 resume características de interés de lipasas estructurales y reguladoras identificadas en *F. oxysporum*, incluyendo su peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) teóricos según datos deducidos de la web (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html).

Tabla 12. Características de genes lipasas estructurales y reguladores identificados en este trabajo.

Número de acceso ¹	Gen	Cromosoma	Gen con intrones (nt)	ORF (nt)	Tamaño Proteína (aa)	Tamaño proteína ²	pI ²	Péptido señal ³
Lipasas estructurales								
FOXG_07600	<i>lip1</i>	4	1136	1041	347	36.55	6.38	1-16
FOXG_07142	<i>lip1.2</i>	6	1169	738	246	32.55	5.23	1 - 19
FOXG_00147	<i>lip2</i> *	1	1218	1218	406	45.18	5.43	1 - 17
FOXG_13474	<i>lip3</i>	12	1835	1620	540	58.49	5.13	1 - 25
FOXG_02646	<i>lip4</i>	5	1778	1686	562	60.77	7.64	1 - 24
FOXG_09554	<i>lip5</i>	11	1605	1602	534	57.93	8.99	1 - 18
FOXG_05802	<i>lip6</i>	2a	1680	1677	559	61.27	6.06	1 - 18
FOXG_07635	<i>lip7</i> *	4	1667	1614	538	58.60	8.68	1 - 19
FOXG_08230	<i>lip8</i>	2a	1752	1596	532	93.93	6.40	1 - 19
FOXG_09590	<i>lip9</i>	11	1658	1602	534	58.74	7.96	1 - 20
FOXG_09686	<i>lip10</i>	11	1865	1809	603	65.19	5.62	1 - 21
FOXG_09995	<i>lip11</i>	11	2521	1656	552	60.17	5.64	1 - 21
FOXG_10043	<i>lip12</i>	11	1656	1653	551	61.29	8.93	1 - 20
FOXG_11103	<i>lip13</i>	1	1755	1752	584	63.03	5.09	1 - 19
FOXG_12933	<i>lip14</i>	9	2337	2334	778	88.13	5.65	1 - 19
FOXG_13336	<i>lip15</i> *	12	1979	1623	541	59.00	5.28	1 - 17
FOXG_14499	<i>lip16</i>	12	1686	1683	561	62.60	6.20	1 - 25
FOXG_14512	<i>lip17</i>	12	1624	1569	523	57.24	8.66	1 - 20
FOXG_15258	<i>lip18</i>	5	1634	1584	528	57.30	8.14	1 - 17
FOXG_15259	<i>lip19</i> *	5	1677	1473	491	53.80	9.37	1 - 23
FOXG_15569	<i>lip20</i>	15	1074	1074	358	38.09	5.59	1 - 20
FOXG_16028	<i>lip21</i>	No localizado	1074	1074	358	38.16	5.44	1 - 20

FOXG_16927	<i>lip22</i>	13	1347	1347	449	48.12	5.58	1 - 20
FOXG_17012	<i>lip23</i>	No localizado	1800	1704	568	62.19	9.09	1 - 21
FOXG_17501	<i>lip24</i>	No localizado	1569	1566	522	56.69	9.25	1 - 24
Reguladores lipasas								
FOXG_04196	<i>ctf1</i>	4	3176	2709	903	100.77	6.93	NO
FOXG_01610	<i>ctf2</i>	5	3200	2658	886	98.61	6.45	NO

¹Número de acceso según la página web (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/); ²Peso molecular en KiloDaltons (kDa) y punto isoeléctrico (pI) teóricos obtenidos de la web (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html); ³Sitios de corte del péptido señal obtenido mediante *SignalP v4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); *Secuencias de genes modificadas manualmente.

2.1.2 Relaciones filogenéticas entre genes lipasas estructurales y entre genes reguladores de *F. oxysporum* con ortólogos de especies fúngicas relacionadas

En una primera aproximación se determinó la identidad existente entre las lipasas de *F. oxysporum* y las ortólogas de las especies relacionadas *F. graminearum* y *F. verticillioides* según la base de datos de la web (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/) observándose, en general, una elevada identidad (70-97 %) (Tabla 13).

Para un análisis más detallado se alinearon las 25 lipasas de *F. oxysporum*, desvelándose un grado de identidad del 15-25 %, que aumentaba hasta el 50-60% cuando la comparación se limitó a la región conservada que contiene el pentapéptido GX SXG (Figura 13).

Tabla 13. Identities entre secuencias de amino ácidos deducidos de genes de lipasas estructurales de *F. oxysporum* con sus ortólogas en *F. graminearum* y *F. verticillioides*, incluyendo la más próxima en cada caso, según valores de las bases de datos.

<i>F. oxysporum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
Número de acceso	Proteína	Número de acceso	Identidad (%)	Número de acceso	Identidad (%)
FOXG_07600	Lip1	FGSG_05906 (FGL1)	77	FVEG_04529	90
FOXG_07142	Lip1.2	No identificada		No identificada	
FOXG_00147	Lip2	FGSG_01240 (FGL2)	59	FVEG_01369	82
FOXG_13474	Lip3	FGSG_11386	81	FVEG_13926	94

FOXG_02646	Lip4	FGSG_06437	45	FVEG_14182	40
FOXG_09554	Lip5	FGSG_03583 (FGL5)	68	FVEG_14091	85
FOXG_05802	Lip6	FGSG_09181	80	FVEG_03675	91
FOXG_07635	Lip7	FGSG_05935	70	FVEG_04559	82
FOXG_08230	Lip8	FGSG_13655	86	FVEG_06442	97
FOXG_09590	Lip9	FGSG_03601	66	FVEG_08870	88
FOXG_09686	Lip10	FGSG_03687	78	FVEG_08785	88
FOXG_09995	Lip11	FGSG_03243	69	FVEG_08518	89
FOXG_10043	Lip12	FGSG_03209 (FGL4)	78	FVEG_08461	93
FOXG_11103	Lip13	FGSG_01603 (LIP1)	79	FVEG_09694	88
FOXG_12933	Lip14	FGSG_10982	86	FVEG_11695	97
FOXG_13336	Lip15	No identificada		FVEG_12206	79
FOXG_14499	Lip16	No identificada		FVEG_13339	89
FOXG_14512	Lip17	FGSG_09099	80	FVEG_13359	93
FOXG_15258	Lip18	No identificada		No identificada	
FOXG_15259	Lip19	FGSG_03095	65	FVEG_12524	93
FOXG_15569	Lip20	No identificada		No identificada	
FOXG_16028	Lip21	No identificada		No identificada	
FOXG_16927	Lip22	FGSG_03846	75	FVEG_12905	93
FOXG_17012	Lip23	FGSG_10713	91	FVEG_05540	36
FOXG_17501	Lip24	No identificada		No identificada	

El árbol filogenético de las proteínas de *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides* se obtuvo mediante alineamiento de las secuencias de amino ácidos deducidos de las lipasas estructurales secretadas (Figura 14). Dicho análisis reveló la presencia de 25 lipasas en *F. oxysporum*, 23 en *F. graminearum* y 19 en *F. verticillioides*. Estas proteínas se agrupan en 4 clados: Uno mayoritario, conteniendo 20 lipasas de *F. oxysporum* denominado esterasas / lipasas (cd00312); otras 3 lipasas de *F. oxysporum* englobadas en el grupo denominado lipasas clase 3 (cd00519); otra perteneciente al grupo de lipasas secretadas (cl14925); y la última a la familia de las prolil-oligopeptidasas (pfam00326).

Pentapéptido

G X S X G

```

Lip4 (196) V A N L G L H D Q R L A L H W I H E N I G A F G G D P T R I T I H G E S S G A - - I S V G H H L L A Y G G R D D (247)
Lip6 (179) V G N N G F R D Q R L A L Q W I Q E N I A A F G G D P E K V T I W G Q S G G A - - R S I A S Q L T A F G G R D D (232)
Lip7 (191) Q W N L G F L D Q R L A L T W V Q D N I A A F G G D P K K V T I F G E S A G A - - G S V D D L I T A P P D P L - (243)
Lip8 (172) N A N A G L L D Q R L A L R W I Q E N I E A F G G D P E R V V V W G E S A G A - - Q S I A Y Q M F S Y D G R D D (225)
Lip5 (205) N L N L A L L D Q R L A V K W V R D N I A R F G G D P N R I T L W G E S A G A - - Y A T D G Y L F A W P R N P - (257)
Lip9 (153) - - - V G L H D Q R K A F Q W V Q K H I S K F G G N P D H V V I G G E S A G A - - A S V S L H L S A Y G G K D E (203)
Lip10 (212) A G N L G F K D Q R L A M R W L Q D N V A A F G G S P D K V T I W G E S A G A - - R S L G M Q L V A Y E G Q H N (264)
Lip11 (162) V A N L G L K D Q R I A L H W V K E N I A A F G G D P S K V T I F G E S A G G - - G N V G Y Q A M A Y G G V D E (215)
Lip12 (165) L S N L G I R D Q R F F L E F V Q K H I G A F G G D K G A V T I G G R S A G G - - H S V G I H Y F H N Y G K D - (217)
Lip13 (201) S S N L G L L D Q R M G L Q W V A D N I A S F G G D P D K V T I W G E S A G A - - I S V L D Q M V L Y G G D A D (254)
Lip3 (155) T Q N F S I L D V E K A L D W V H K N I R A F G G N P D H I V F G G H S S G G - - V Q V D H Y L W N N P N T F - (204)
Lip16 (164) L L N L G L Q D Q R F F L Q F L Q K H L S S F G G D P R Q I T L G G L S A G A - - H S T A F H Y F H N Y G S D K (214)
Lip17 (178) T Q N L G L R D Q R A A V E W V R D N I W R F G G N P S K I T I A G Q S S G G - - V A V D Y W T Y A Y K K D P - (230)
Lip18 (153) - T N L G L R D Q R M A L Q W V Q E N I A E F G G D P K K V T L W G F S A G A - - M S A F D H T I I N N G N A N (205)
Lip19 (170) - - N V G L L D Q R M V V E W T R D N I A A F G G D P Q K M T L W G Q S A G A - - G S V G M Y G Y A Y P K D L - (220)
Lip20 (184) V A N L G L L D Q R L A L E W V A D N I A A F G G D P D A V T I W G E S A G A - - M S V F S Q M A L Y D G N N K (237)
Lip21 (184) V A N L G L L D Q R L A L E W V A D N I A A F G G D P D A V T I W G E S A G A - - M S V F S Q M A L Y D G N N K (237)
Lip23 (165) D S N M G F R D Q R V S L H W I H E N N A A F G S D P S K V T I W G Q S A G A - - A S V G A Q I L A Y N G R D D (218)
Lip24 (166) S T N L G Y R D Q R L A L H W I K E N I A N V G G D S E R V T L W G E S S G A - - F S V G S Q L V A Y G G R D D (219)
Lip15 (186) - - - A A L Y D Q R L A L E W I Q E N I H Q F G G D P T R V T F M G E S A G D G L Y V P E N P D K L F A E G R H (238)
Lip2 (181) M G F L Q S W K N A R R L V L P Q L R Q L R L Q Y P S Y P V Q Q G G H S L G G - - - S V A C L A A L E L K V S L (233)
Lip1.2 (135) W G F W T S W V A A R G P V L Q V I R T A A A I N P G F R I V V T G H S L G G - - - A I A S L A A A E L R N - - (185)
Lip1 (139) S G F Q R A W N E I S S Q A T A A V A S A R K A N P S F K V I S T G H S L G G - - - A V A V L A A A N L R V - - (189)
Lip22 (175) - V I S G H A T L D S I R A V L S L G L G L N T T N - P R V A L W G Y S G G A L A S E W A S E L A V Q Y A P D L (228)
Lip14 (588) L G K L E P L D Q I W A A E Q - - L I K R Y S F I N A D K I G M W G W S Y G G Y L T A K T V E A D S G V F S F - (640)

```

Figura 13. Alineamiento de los dominios conservados que incluyen el pentapéptido GXSXG de las 25 lipasas extracelulares identificadas en *F. oxysporum*, usando el método *ClustalW* con el programa *Bioedit v7.0.0*.

Los reguladores Ctf1 y Ctf2, se alinearon con otros ortólogos de especies fúngicas relacionadas (Figura 15A). Dicho alineamiento mostró identidades del 50-60 % con respecto a las descritas en *A. nidulans*, FarA y FarB (Hynes et al, 2006), y del 90 % con Ctf α y Ctf β de *F. solani* (o *Nectria haematococca*) (Li & Kolattukudy, 1997; Li et al, 2002). El árbol filogenético deducido de dicho alineamiento mostró dos clados diferenciados, uno incluyendo a Ctf1 y otro a Ctf2 (Figura 15B).

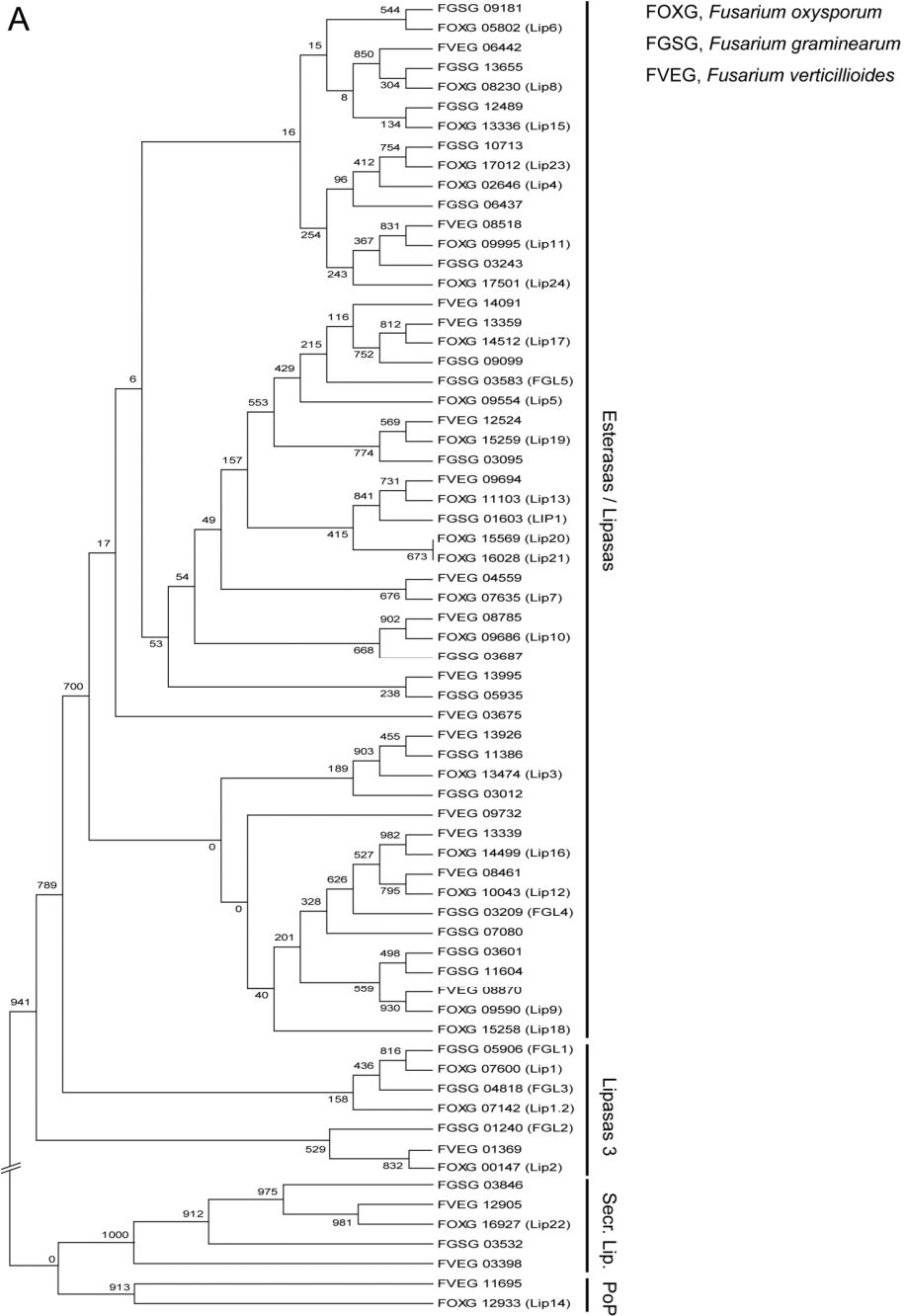
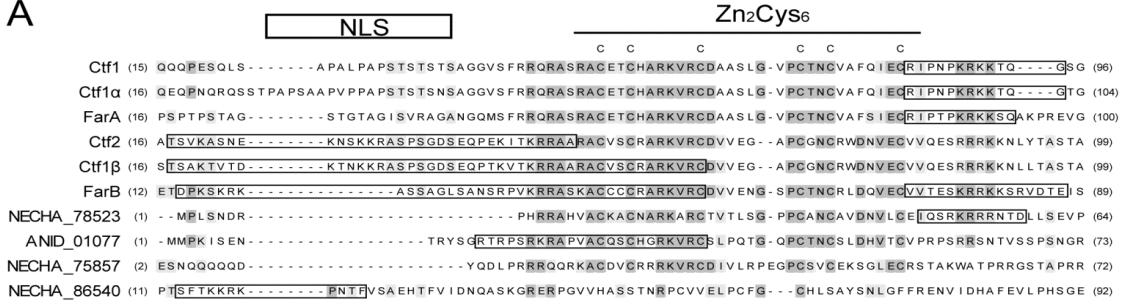


Figura 14. Análisis filogenético de lipasas estructurales de *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides* mediante el programa *PHYML v3.0* usando el método de máxima parsimonia optimizado por el programa *MODELGENERATOR v0.85*. El resultado se muestra como un árbol filogenético representado con el programa *MEGA v4*. Las lipasas se agrupan en cuatro clados según lo establecido en la base de datos del NCBI: esterasas / lipasas, lipasas clase 3, lipasas secretadas (Secr. Lip.), y prolil-oligopeptidasas (PoP).

A



B

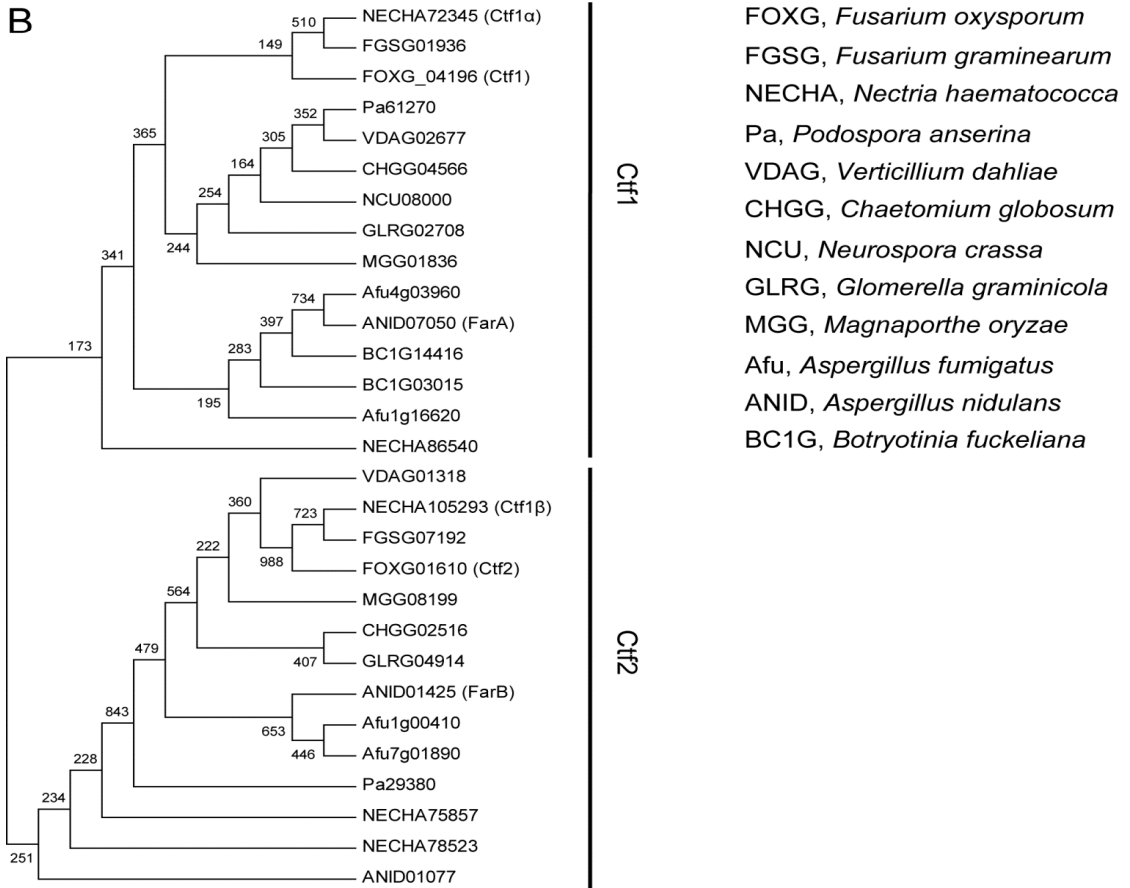


Figura 15. Análisis filogenético entre Ctf1 y Ctf2 de *F. oxysporum* con ortólogos de especies relacionadas, según los datos disponibles en la web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. **A** Alineamiento de la región conservada que contiene el dominio Zn(II)₂Cys₆ entre Ctf1 y Ctf2 de *F. oxysporum*, y otros factores de *A. nidulans* y *N. haematococca*. Las regiones de localización nuclear (NLS) y el dominio de unión a ADN (Zn₂Cys₆) están indicados. Los alineamientos se realizaron usando el método *ClustalW* con el programa *Bioedit v7.0.0*. **B** Árbol filogenético mostrando las relaciones entre los factores reguladores de las especies fúngicas indicadas, construido usando el programa *PHYML v3.0* según el modelo de máxima parsimonia deducido con el programa *MODELGENERATOR v0.85* y representado con el programa *MEGA v4*.

2.1.3 Análisis de la región promotora

El análisis de la región promotora de los 25 genes lipasas de *F. oxysporum* reveló que, con excepción de *lip21*, todas contienen un número variable (entre 1 y 8) de sitios para el reconocimiento de factores de transcripción del tipo Zn(II)₂Cys₆. Dichos motivos consisten en la secuencia palindrómica GCC(N)GGC (siendo N un número de nucleótidos variable entre 1 y 42) (Liang et al, 1996) (Tabla 14).

Tabla 14. Secuencias palindrómicas asociadas al reconocimiento de factores de transcripción del tipo Zn(II)₂Cys₆ encontradas en promotores de genes lipasas de *F. oxysporum*.

Gen	Posición ¹	Secuencia palindrómica
<i>lip1</i>	-337	GCCGCGAAGCTTCATTTCCGCTGTTCCGGC
<i>lip1.2</i>	-356	GCCAACGCC
<i>lip2</i>	-1083	GCCCTCACGGGC
	-855	GCCAGGACTGGC
	-800	GCCTTCAACCCGTGAGGGAGGC
	-712	GCCTGGTAGTCAGGC
<i>lip3</i>	-582	GCCTCGGATCCATCTGGC
	-170	GCCGCTCGGAAATTCTTCGTCTCTGATATAGGC
<i>lip4</i>	-1044	GCCCCGCGGC
	-848	GCCATTGGC
	-737	GCCTTCGGC
<i>lip5</i>	-1004	GCCAACGACGTGGGGACTCAGTACTACGGGTGTGGC
	-494	GCCTCAGAAAGGC
<i>lip6</i>	-390	GCCACAATATTTTCATCGGC
<i>lip7</i>	-719	GCCAATACTATGAGCGTATTGGGAGGC
	-449	GCCTCGGCTTTTCATTTTCGTCAGAGGC
<i>lip8</i>	-985	GCCTTGGGGC

	-576	GCCTAAAGGC
	-21	GCCAAAGTGGC
<i>lip9</i>	-1110	GCCCTATCTTAAGGC
	-1046	GCCCCGCGGTTTGAAGTCGCGGC
	-298	GCCCGCAAAGAGAATTGAAACTGGC
	-257	GCCATGATGCC
<i>lip10</i>	-611	GCCTTCGGC
<i>lip11</i>	-88	GCCCGTGGC
<i>lip12</i>	-247	GCCAATGACTTGGC
<i>lip13</i>	-1142	GCCATTTCAATACTGGC
	-776	GCCCGAACTACGGC
<i>lip14</i>	-1073	GCCCTTGAGACTTTTCATGGTCATGATTCATTCATTCCGGGC
	-959	GCCAAAGGGC
<i>lip15</i>	-1048	GCCATCCAGGGC
<i>lip16</i>	-807	GCCTTGGCAGCATCTGGC
	-234	GCCTTGTCCTTTGTGCGAGTTCAGGC
<i>lip17</i>	-865	GCCATGATTGTGCGATGCCATCGGC
	-704	GCCAATGGTGCAATAGACCTATGTCACTCGGC
	-632	GCCGGGC
	-536	GCCACGACAGGGC
	-194	GCCCCTGTCAAACCGTTGATCCGGAGAGGTCGGC
<i>lip18</i>	-1033	GCCGTAGAAGCTGGC
	-817	GCCGGGC
	-264	GCCTCGCAAGGC
<i>lip19</i>	-619	GCCTGACATGGC
<i>lip20</i>	-144	GCCCATATGCTTACCAACCATTAATTTAAAGACTTCTGTAACCTGGC
<i>lip21</i>		NO ENCONTRADAS

<i>lip22</i>	-703	GCCAATTCACAAATCGGGC
	-521	GCCTTGGC
	-502	GCCTGTTTGGGC
	-487	GCCTCTCAACAGTGGC
	-413	GCCCAGTAAGTATTTCTCCGCTAAAACATCACAAGGC
	-186	GCCAAACTCGGC
	-107	GCCTCGGCTCGGC
	-48	GCCGTTGCCCAAGGGTTAGACTGGC
<i>lip23</i>	-828	GCCCACATGATGGC
	-109	GCCCAAGTAGTTGAATATGATCGACATGGC
<i>lip24</i>	-686	GCCTAGTCTTCATGCACCTGGGGC
	-628	GCCAACTGAGAACGGC
	-361	GCCTCTGAGCTAGTGACATGGC

¹Posición con respecto al codón de inicio de la traducción

Se destaca también que trece genes de lipasas estructurales así como el regulador *ctf1* contienen en sus promotores la secuencia CCTCGG o su complementaria CCGAGG asociada presumiblemente a la regulación por ácidos grasos mediado por factores de transcripción Zn(II)₂Cys₆ en *A. nidulans* (Tabla 15) (Hynes et al, 2006).

Tabla 15. Secuencias CCTCGG/CCGACGG, relacionadas con la regulación por ácidos grasos, presentes en los promotores de los genes indicados.

Gen	Posición¹	Secuencia	Gen	Posición¹	Secuencia
<i>lip3</i>	-1029	CCTCGG	<i>lip13</i>	-507	CCTCGG
	-584	CCTCGG	<i>lip19</i>	-391	CCGAGG
<i>lip7</i>	-451	CCTCGG	<i>lip20</i>	-935	CCGAGG
<i>lip8</i>	-129	CCGAGG	<i>lip21</i>	-935	CCGAGG

<i>lip9</i>	-389	CCTCGG	<i>lip22</i>	-358	CCTCGG
<i>lip11</i>	-805	CCTCGG		-109	CCTCGG
	-546	CCTCGG	<i>lip23</i>	-83	CCGAGG
	-299	CCTCGG	<i>ctf1</i>	-666	CCTCGG
<i>lip12</i>	-202	CCGAGG		-378	CCGAGG

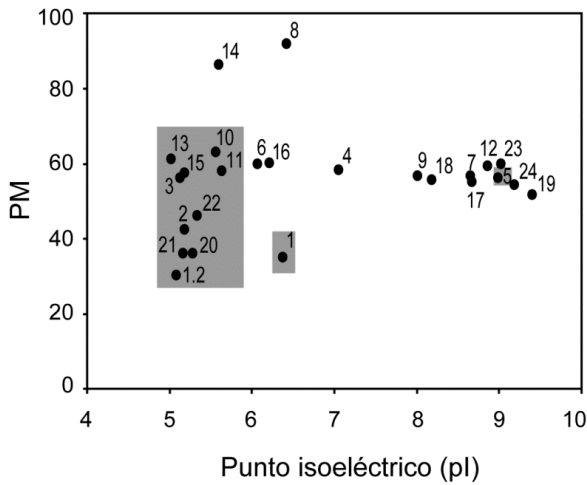
¹Posición con respecto al codón de inicio de la traducción

2.2. Caracterización bioquímica de lipasas extracelulares

2.2.1 Perfil lipolítico extracelular

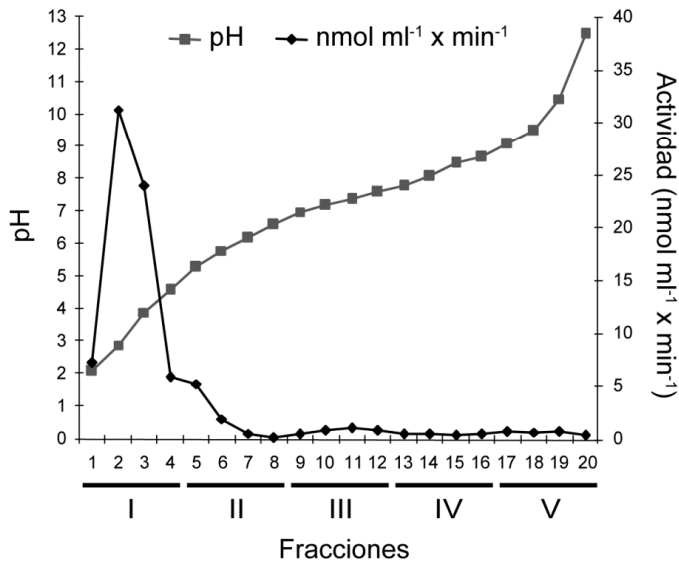
Para determinar el perfil lipolítico de las 25 lipasas estructurales identificadas en *F. oxysporum*, se calculó su peso molecular y punto isoeléctrico teórico (Figura 16A). Para investigar y validar el perfil enzimático extracelular, los sobrenadantes de cultivos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* estirpe 4287 inducidos en WGO, se dializaron, concentraron y sometieron a IEF preparativo con un rango de pH 3-10. Se determinó la actividad lipasa de las 20 fracciones recogidas mediante ensayos de actividad usando como sustrato pNPP. Como se observa en la figura 16B, las fracciones con pH más ácido (2.3-4.5) contienen las proteínas con pl más bajo y concentran el 75 % de la actividad total, mientras que el 15 % restante se incluye en el resto de las fracciones (pH neutro o alcalino). Las fracciones obtenidas se reunieron en grupos de 4: 1-4 (I), 5-8 (II), 9-12 (III), 13-16 (IV) y 17-20 (V) y las proteínas de cada grupo se separaron en gel de poliacrilamida (Figura 16C). Se observó que en las dos primeras fracciones (I y II) la mayoría de las proteínas tenían un peso molecular inferior a 25 kDa, siendo de mayor tamaño el resto. Por lo deducido de estos resultados, nuestro estudio se centró en proteínas con pl bajo, y masa molecular inferior a 25 kDa. Las proteínas Lip1, Lip2 y Lip5 también se incluyeron en el estudio por ser ortólogas en *F. graminearum* donde habían mostrado ser esenciales en patogénesis (Voigt *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2010).

A



Proteína deducida	PM (kDa)	pI	Proteína deducida	PM (kDa)	pI
Lip13	61,16	5,02	Lip1	35,03	6,38
Lip1.2	30,47	5,08	Lip8	91,93	6,42
Lip3	56,11	5,13	Lip4	58,34	7,05
Lip21	36,15	5,17	Lip9	56,65	8,01
Lip2	42,44	5,18	Lip18	55,67	8,18
Lip15	57,40	5,18	Lip7	56,80	8,65
Lip20	36,08	5,28	Lip17	55,18	8,67
Lip22	46,11	5,34	Lip12	59,38	8,86
Lip10	63,16	5,56	Lip5	56,14	8,99
Lip14	86,33	5,60	Lip23	60,01	9,02
Lip11	58,16	5,64	Lip24	54,35	9,19
Lip6	59,81	6,07	Lip19	51,80	9,40
Lip16	60,28	6,21			

B



C

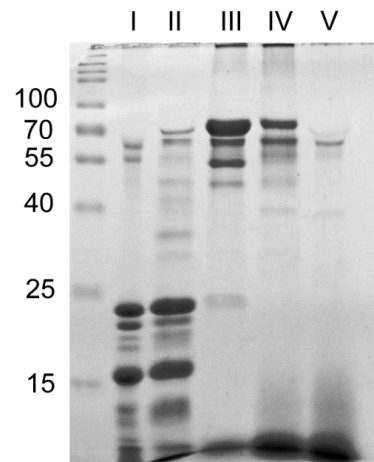


Figura 16. Perfil lipídico extracelular de la estirpe silvestre 4287 de *F. oxysporum*. **A)** Representación 2-D de lipasas extracelulares deducidas según el peso molecular (PM) y el punto isoelectrico (pI) teóricos de las secuencias de aminoácidos sin péptido señal. Las lipasas con bajo pI, así como Lip1 y Lip5 aparecen sombreadas. **B)** Perfil de actividad lipídica obtenido tras IEF preparativo de sobrenadantes de cultivos concentrados y dializados, obtenidos de la estirpe silvestre en medio SM inducido en 2% de WGO. Se determinó el pH y la actividad lipasa de las veinte fracciones. **C)** Las fracciones se reunieron en cinco grupos (I-V) y las proteínas presentes de cada grupo se separaron en gel de acrilamida (SDS-PAGE). Los números indican el peso molecular en kDa.

2.2.2 Expresión *in planta* de genes lipasas extracelulares durante la infección de tomate

Se determinó la expresión de genes lipasas de *F. oxysporum in planta* mediante qRT-PCR usando cebadores específicos (Tabla 4) sobre ADNc obtenido del ARN de raíces y tallos de plantas de tomate infectadas con la estirpe silvestre ras diferentes tiempos post-infección. No se observó expresión en plantas no inoculadas (control). El gen de la actina fue el control endógeno, observándose expresión en raíces y tallos en todos los tiempos analizados. Se analizó la expresión de genes lipasas con pl bajo, además de *lip1* y *lip5*, resultando un total de 13 genes analizados (*lip1*, *lip1.2*, *lip2*, *lip3*, *lip4*, *lip5*, *lip10*, *lip11*, *lip13*, *lip15*, *lip20*, *lip21* y *lip22*). Entre los genes analizados, *lip1*, *lip3* y *lip22* mostraron expresión más elevada en raíz que el resto (15-20 % con respecto al gen *actina*) con picos de expresión a diferentes tiempos post-inoculación (Figura 17). Un segundo grupo de genes, *lip1.2*, *lip2*, *lip10*, *lip13* y *lip21*, mostró expresión más reducida (0.5 % en relación al gen *actina*). Por último, en el resto de los genes analizadas no se detectó expresión alguna (datos no mostrados).

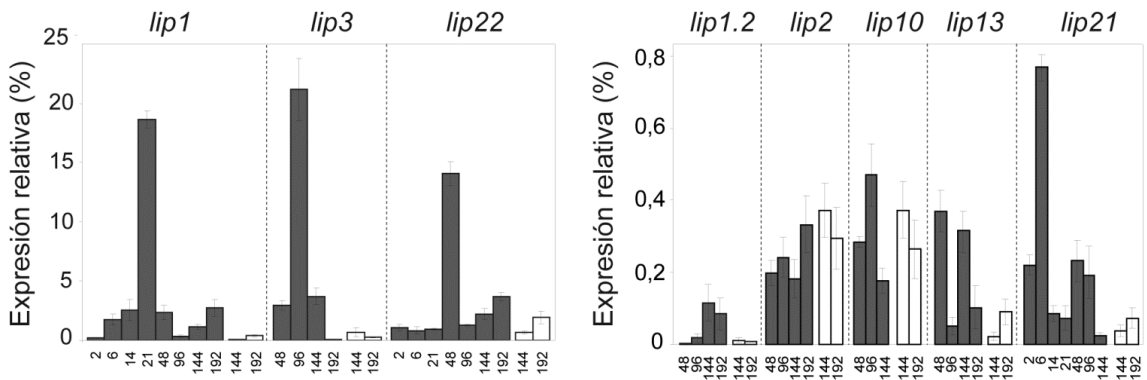


Figura 17. Expresión de genes lipasas mediante análisis por qRT-PCR durante la infección de *F. oxysporum* en plantas de tomate. Las muestras de ARN fueron extraídas de raíces (barras oscuras) o tallos (barras blancas) obtenidas entre 2 y 192 horas tras la infección de las plantas de tomate. Las barras representan el error estándar calculado a partir de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

2.3. Obtención de estirpes mutantes

Teniendo en cuenta la expresión detectada durante el proceso de infección, se consideró que *lip1*, *lip3* y *lip22* eran buenos candidatos para ser inactivados mediante interrupción dirigida, además de *lip2* y *lip5* por ser ortólogos a *fgl2* y *fgl5* de *F. graminearum*, que habían mostrado ser esenciales para la infección. Por otra parte, también se interrumpieron los genes reguladores *ctf1* y *ctf2*.

Para determinar la implicación de dichos genes lipasas, así como de ambos reguladores, en la utilización de los ácidos grasos así como en la patogénesis de *F. oxysporum* se generaron estirpes mutantes mediante reemplazamiento génico usando la técnica del *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003), que permite sustituir el alelo silvestre por un marcador seleccionable. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que permitían amplificar mediante PCR fragmentos de aproximadamente 1 kb flanqueantes a la ORF del gen diana, en los extremos -5' y -3', a partir de ADNg. Cada fragmento, por separado, se fusionó al 75 % del casete de resistencia a higromicina B (Hyg^R) mediante PCR de fusión (Carroll *et al.*, 1994), resultando en dos construcciones solapantes. Estas se utilizaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre, con el objetivo de reemplazar el gen diana por el casete Hyg^R. Los transformantes obtenidos se analizaron inicialmente mediante PCR y posteriormente se verificaron por análisis *Southern*. En todos los casos, se obtuvieron transformantes con la ORF del gen diana correspondiente reemplazada por el casete Hyg^R (Figuras 18-24).

2.3.1 Interrupción dirigida de *lip1*

Algunos transformantes obtenidos para sustituir *lip1* por el casete Hyg^R no mostraron banda de amplificación de la ORF tras PCR con cebadores específicos (Figura 18B), mostrando un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de cada región, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 18C).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 6reD-E). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Xho* I, se separó en electroforesis y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *lip1* (a) y a la región 5' (b). Se comprobó que, en

los transformantes #1, #6 y #8, desaparecía la banda de 4.3 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 1.8 kb correspondiente al extremo 5' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo al casete Hyg^R .

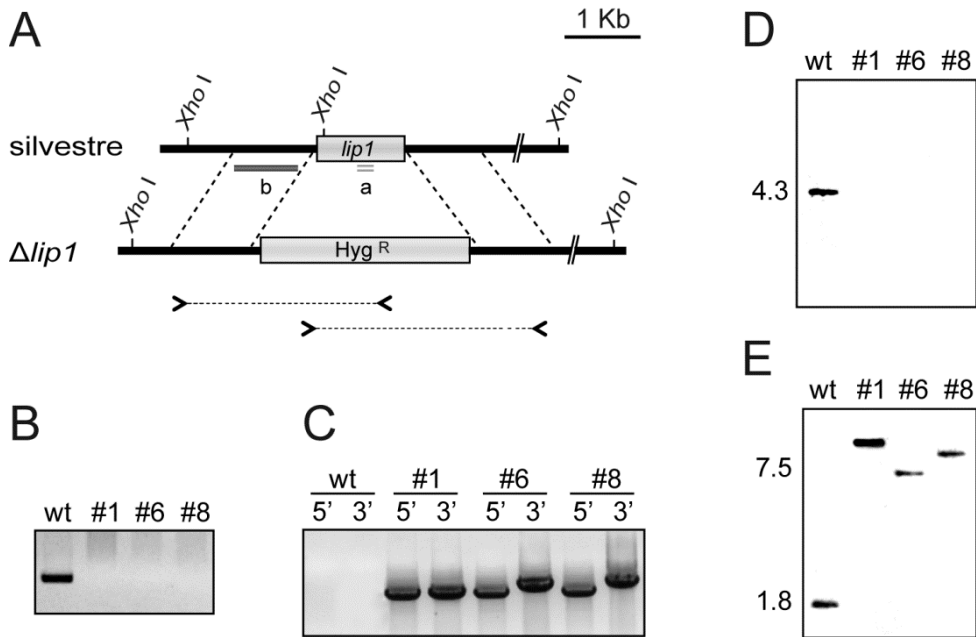


Figura 18. Interrupción dirigida del gen *lip1*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete Hyg^R como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación Southern se indican como "a" y "b" y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Xho* I. **B-F** Comprobación de la interrupción de *lip1* en los transformantes #1, #6 y #8, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: **(B)** PCR de la región codificante del gen *lip1*; **(C)** PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete Hyg^R tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; **(D-E)** Análisis Southern del ADNg tratado con *Xho* I usando como sondas las regiones indicadas: "a" **(D)** o "b" **(E)**. Los números indican tamaños en kb.

2.3.2 Interrupción dirigida de *lip2*

Algunos transformantes obtenidos para deletar el gen *lip2* mediante integración del casete Hyg^R mostraban la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 19B).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 19C-D). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Xho* I y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *lip2* (a) y a la región 5' (b). Se comprobó que, en los transformantes #1, #2 y #3, desaparecía la banda de 0.6 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 1.4 kb correspondiente al extremo 5' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo al casete *Hyg^R*.

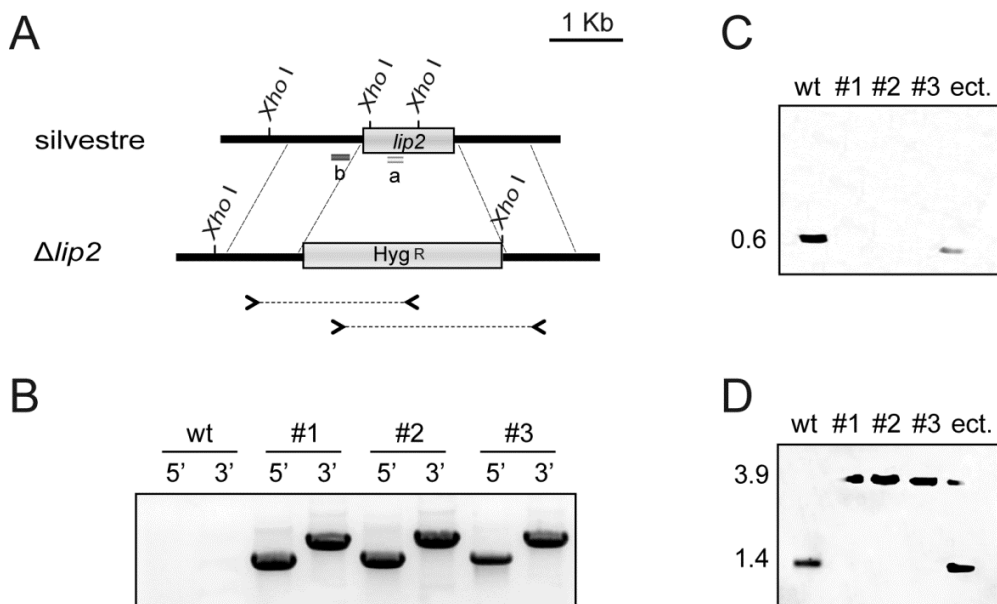


Figura 19. Interrupción dirigida del gen *lip2*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete *Hyg^R* como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación *Southern* se indican como “a” y “b” y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Xho* I. **B-D** Comprobación de la interrupción de *lip2* en los transformantes #1, #2 y #3, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: **(B)** PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete *Hyg^R* del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; **(C-D)** Análisis *Southern* del ADNg tratado con *Xho* I usando como sondas las regiones indicadas: “a” **(C)** o “b” **(D)**. Los números indican tamaños en kb.

2.3.3 Interrupción dirigida de *lip3*

Algunos transformantes obtenidos para deletar al gen *lip3* mediante integración del casete *Hyg^R* mostraban la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con

un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 20B).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 20C-D). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Hind* III y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *lip3* (a) y a la región 3' (b). Se comprobó que, en los transformantes #18, #37 y #43, desaparecía la banda de 1.7 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 0.6 kb correspondiente al extremo 3' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo al casete Hyg^R .

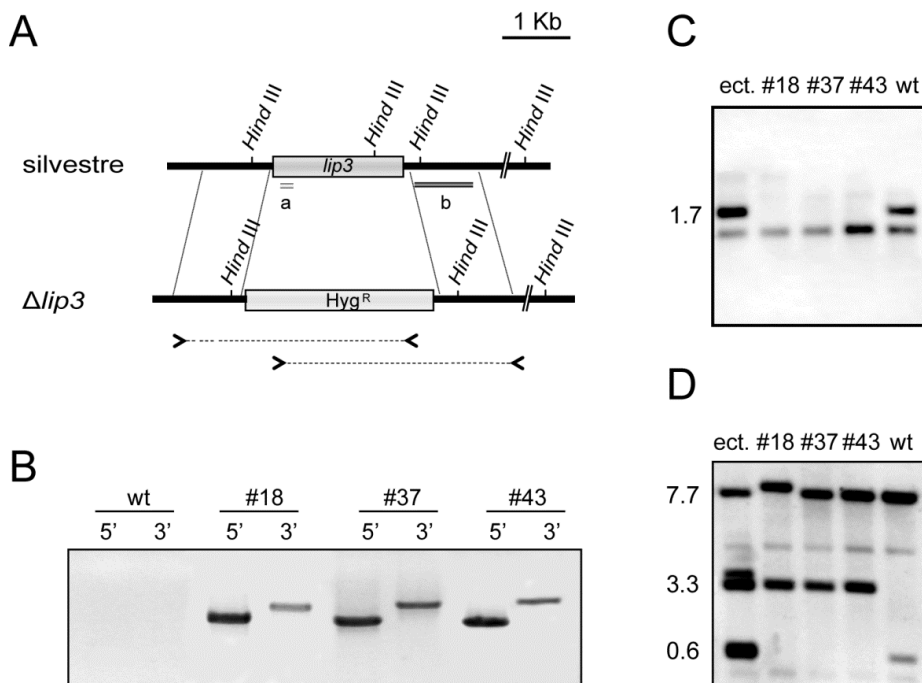


Figura 20. Interrupción dirigida del gen *lip3*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete Hyg^R como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación *Southern* se indican como "a" y "b" y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Hind* III. **B-D** Comprobación de la interrupción de *lip3* en los transformantes #18, #37 y #43, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: (**B**) PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete Hyg^R tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; (**C-D**) Análisis *Southern* del ADNg tratado con *Hind* III usando como sondas las regiones indicadas: "a" (**C**) o "b" (**D**). Los números indican tamaños en kb.

2.3.4 Interrupción dirigida de *lip5*

Algunos transformantes obtenidos para sustituir *lip5* por el casete Hyg^R mostraban la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 21B).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 21C-D). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Hind* III y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *lip5* (a) y al casete Hyg^R (b). Se comprobó que, en los transformantes #4 y #5, desaparecía la banda de 5.6 kb correspondiente a la ORF y aparecía una banda correspondiente al casete Hyg^R .

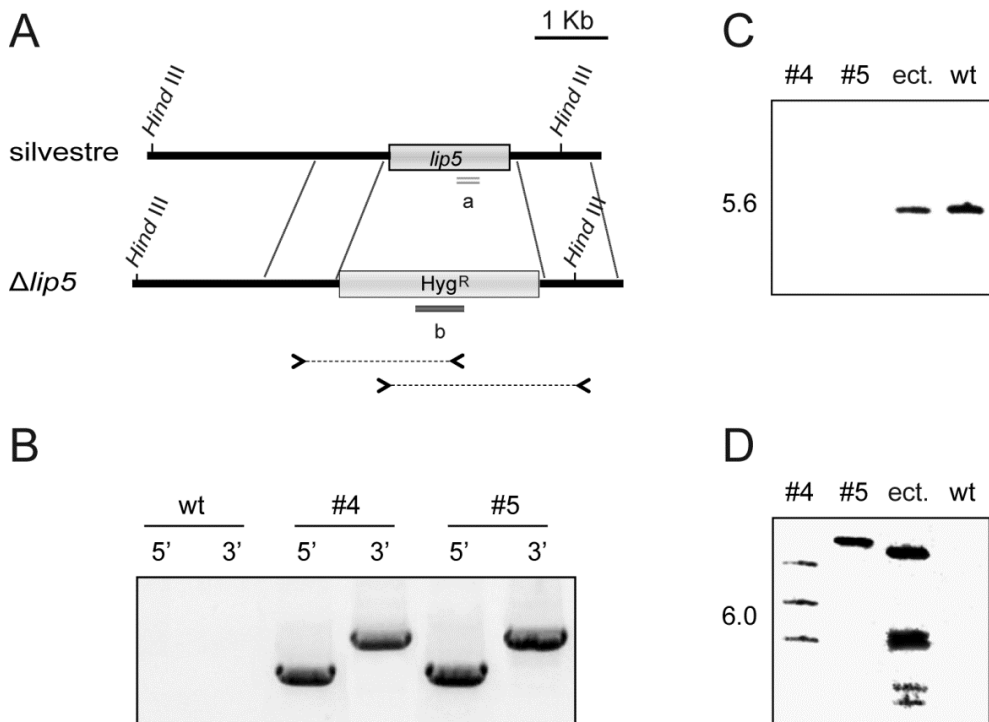


Figura 21. Interrupción dirigida del gen *lip5*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete Hyg^R como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación *Southern* se indican como "a" y "b" y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Hind* III. **B-D**

Comprobación de la interrupción de *lip5* en los transformantes #4 y #5, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: (B) PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete Hyg^R tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; (C-D) Análisis Southern del ADNg tratado con *Hind* III usando como sondas las regiones indicadas: "a" (C) o "b" (D). Los números indican tamaños en kb.

2.3.5 Interrupción dirigida de *lip22*

Algunos transformantes obtenidos para delecionar al gen *lip22* mediante integración del casete Hyg^R mostraban la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 22B).

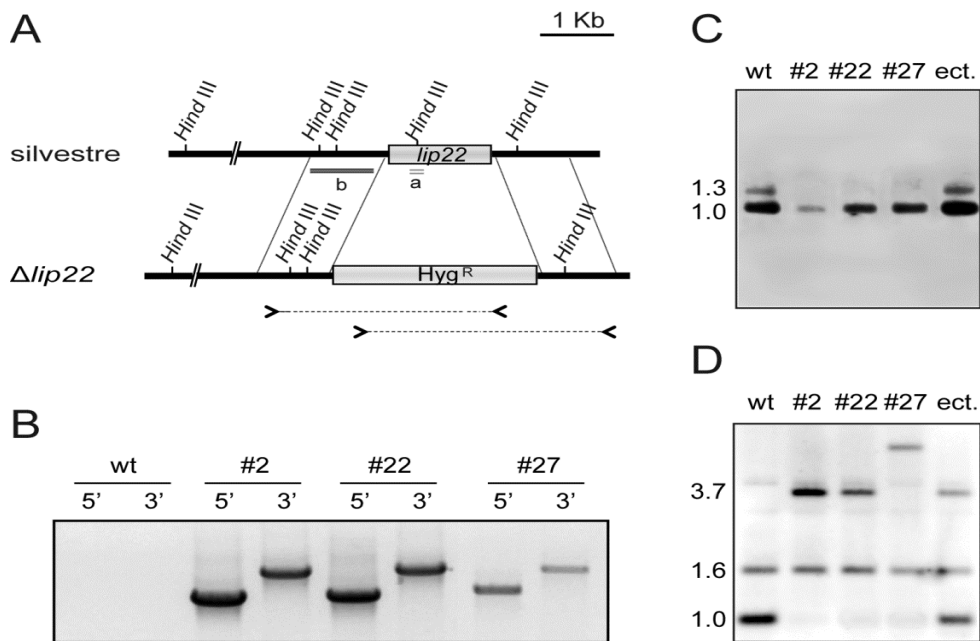


Figura 22. Interrupción dirigida del gen *lip22*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete Hyg^R como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación Southern se indican como "a" y "b" y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Hind* III. **B-D** Comprobación de la interrupción de *lip22* en los transformantes #2, #22 y #27, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: (B) PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete Hyg^R tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; (C-D) Análisis Southern del ADNg tratado con *Hind* III usando como sondas las regiones indicadas: "a" (C) o "b" (D). Los números indican tamaños en kb.

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 22C-D). El ADN_g de los transformantes se trató con la enzima *Hind* III y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *lip22* (a) y a la región 5' (b). Se comprobó que, en los transformantes #2, #22 y #27, desaparecía la banda de 1.3 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 1 kb correspondiente al extremo 5' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo al casete Hyg^R.

2.3.6 Interrupción dirigida de *ctf1*

Algunos transformantes obtenidos para delecionar al gen *ctf1* mediante integración del casete Hyg^R no mostraban banda de amplificación tras la PCR con cebadores específicos de la ORF de *ctf1* (Figura 23C), además se observó la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 23B).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 23D-E). El ADN_g de los transformantes se trató con la enzima *Bam* HI y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *ctf1* (a) y a la región 3' (b). Se comprobó que, en los transformantes #1 y #6, desaparecía la banda de 0.9 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 1.6 kb correspondiente al extremo 3' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo al casete Hyg^R.

2.3.7 Interrupción dirigida de *ctf2*

Algunos transformantes obtenidos para delecionar al gen *ctf2* mediante integración del casete Hyg^R no mostraban banda de amplificación tras la PCR con cebadores específicos de la ORF de *ctf2* (Figura 24B), además se observó la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras amplificación con un cebador interno al casete Hyg^R y otro de la región externa a las empleadas en la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2.5 kb y 3 kb, respectivamente) (Figura 24C).

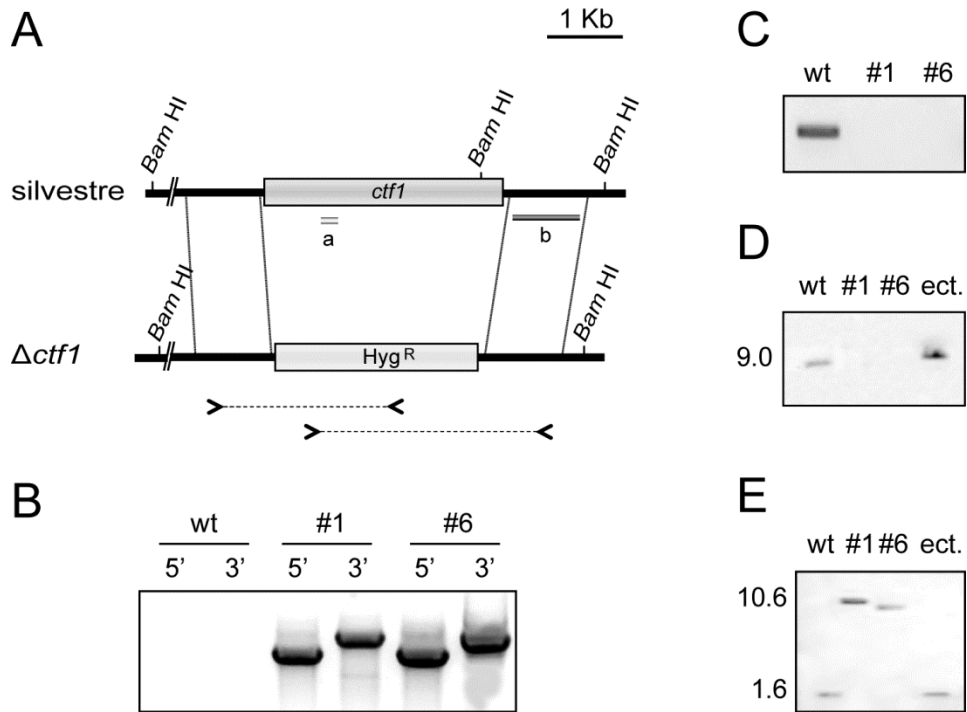


Figura 23. Interrupción dirigida del gen *ctf1*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete *Hyg^R* como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación Southern se indican como "a" y "b" y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Bam* HI. **B-F** Comprobación de la interrupción de *ctf1* en los transformantes #1 y #6, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: **(B)** PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete *Hyg^R* tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; **(C)** PCR de la región codificante del gen *ctf1*; **(D-E)** Análisis Southern del ADNg tratado con *Bam* HI usando como sondas las regiones indicadas: "a" **(D)** o "b" **(E)**. Los números indican tamaños en kb.

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 12reD-E). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Xho* I y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF de *ctf2* (a) y del casete *Hyg^R* (b). Se comprobó que, en los transformantes #1, #5 y #28, desaparecía la banda de 0.7 kb correspondiente a la ORF y aparecía una correspondiente al casete de *Hyg^R*.

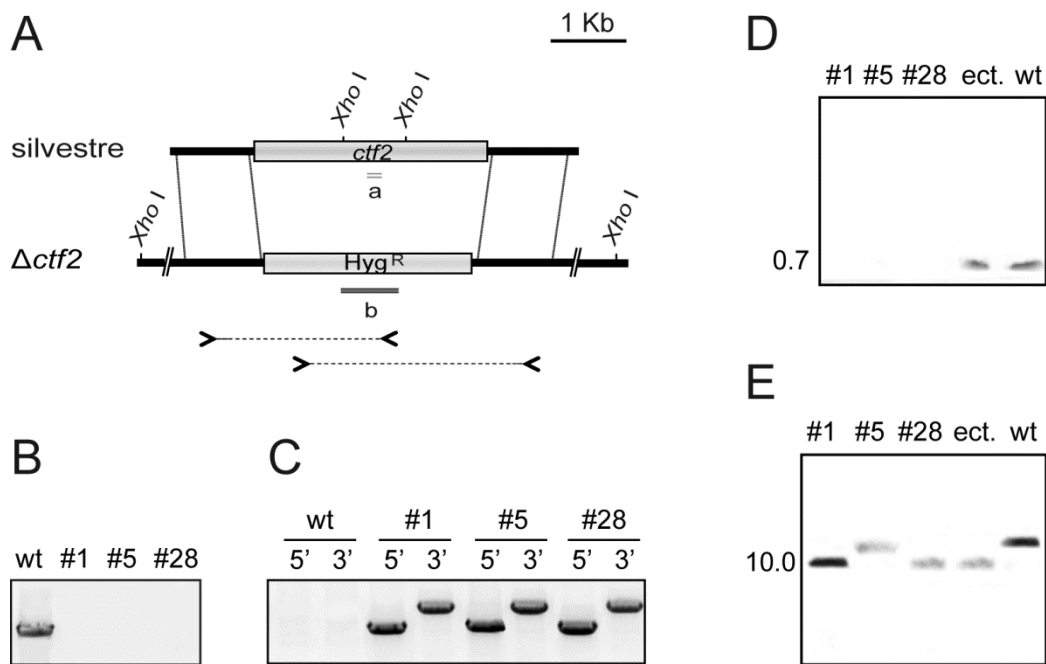


Figura 24. Interrupción dirigida del gen *ctf2*. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y el casete Hyg^{R} como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Las sondas para la hibridación Southern se indican como “a” y “b” y se muestran los sitios de restricción para la endonucleasa *Xho* I. **B-F** Comprobación de la interrupción de *ctf2* en los transformantes #1, #5 y #28, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: **(B)** PCR de la región codificante del gen *ctf2*; **(C)** PCR con un cebador externo a la construcción y otro del casete Hyg^{R} tanto del extremo 3' como del extremo 5' de la construcción; **(D-E)** Análisis Southern del ADNg tratado con *Xho* I usando como sondas las regiones indicadas: “a” **(D)** o “b” **(E)**. Los números indican tamaños en kb.

2.3.8 Interrupción dirigida del gen *ctf1* en el mutante Δctf2 para obtener un doble mutante

Con la finalidad de obtener el doble mutante $\Delta\text{ctf1}\Delta\text{ctf2}$ se transformaron protoplastos del mutante Δctf2 mediante el método de *Split Marker*, usando el casete de resistencia a fleomicina (Phl^{R}) como marcador selectivo.

Un único transformante obtenido no mostró banda de amplificación tras PCR con cebadores específicos de la ORF de *ctf1* ni de *ctf2* (Figura 25B). Además se observó la aparición de un fragmento del tamaño esperado tras la amplificación con un cebador interno a Phl^{R} y otro

localizado en las regiones externas a la construcción, tanto -5' como -3' (aproximadamente 2 kb y 2.5 kb, respectivamente) (Figura 25C).

Posteriormente, se verificó mediante análisis *Southern* el reemplazamiento (Figura 25D-E). El ADNg de los transformantes se trató con la enzima *Bam* HI y se hibridó con sondas pertenecientes a la ORF (a) y a la región 3' (b) de *ctf1*. Se comprobó que, en el transformante #9, desaparecía la banda de 0.9 kb correspondiente a la ORF y que la banda de 1.6 kb correspondiente al extremo 3' era sustituida por otra de mayor tamaño conteniendo el casete *Phi*^R.

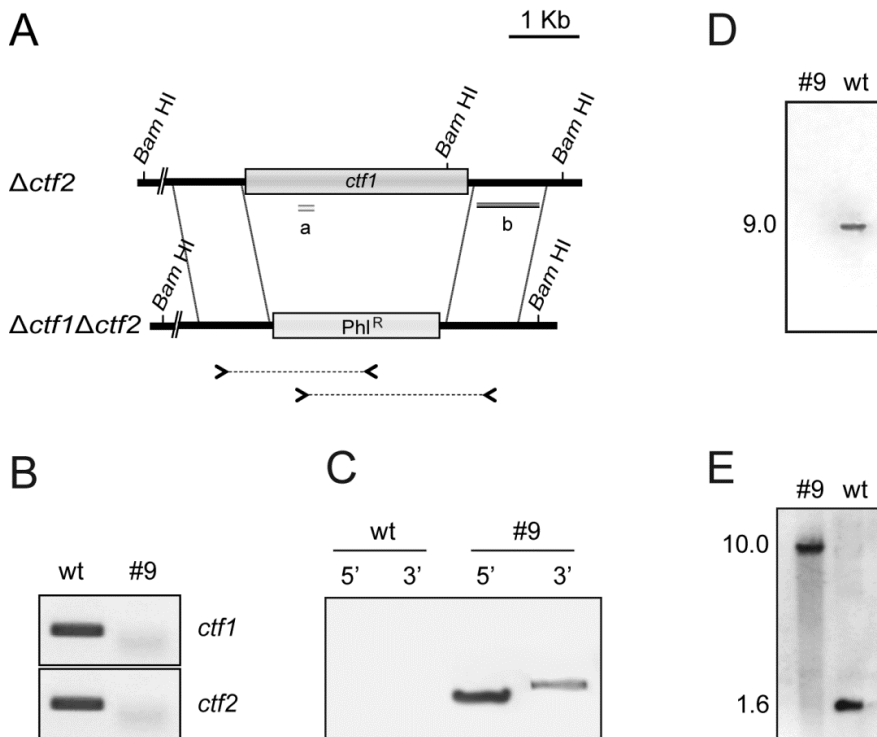


Figura 25. Interrupción dirigida del gen *ctf1* en el mutante $\Delta ctf2$. **A** Estrategia para la sustitución de la región codificante mediante la técnica *Split Marker* y *Phi*^R como fenotipo seleccionable. Las flechas indican los cebadores usados para amplificar los fragmentos fusionados. Se muestran las sondas para la hibridación Southern como "a" y "b" y los sitios de restricción para la endonucleasa *Bam* HI. **B-F** Comprobación de la interrupción de *ctf1* el transformante #9, usando ADNg de la estirpe silvestre (wt) como control: **(B)** PCR con cebadores de la región codificante de *ctf1* y *ctf2*; **(C)** PCR con cebadores externos a la construcción y otro del casete *Phi*^R tanto del extremo 3' como del extremo 5'; **(D-E)** Análisis Southern del ADNg tratado con *Bam* HI usando las sondas indicadas: "a" **(D)** o "b" **(E)**. Los números indican tamaños en kb.

2.3.9 Obtención de estirpes complementadas $\Delta ctf1::ctf1$ y $\Delta ctf2::ctf2$

Con la finalidad de complementar los mutantes $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf2$, se cotransformaron protoplastos de dichos mutantes con una copia funcional de los alelos silvestres *ctf1* y *ctf2*, respectivamente, junto al casete Phl^R . Los transformantes obtenidos se confirmaron mediante PCR y posterior análisis *Southern*.

En la figura 26 se observa que los transformantes con el alelo *ctf1* muestran amplificación tras realizar PCR con cebadores de la ORF del gen, además, tras análisis *Southern* del ADNg tratado con *Eco* RI e hibridado con sondas de la región 3' del gen (a) y del casete Phl^R (b) se observa una banda de 2.3 kb en los transformantes #20 y #32, correspondiente a la ORF de *ctf1*, y adicionalmente otra de tamaño variable dependiendo del sitio de integración y, al menos, una banda correspondiente al casete Phl^R .

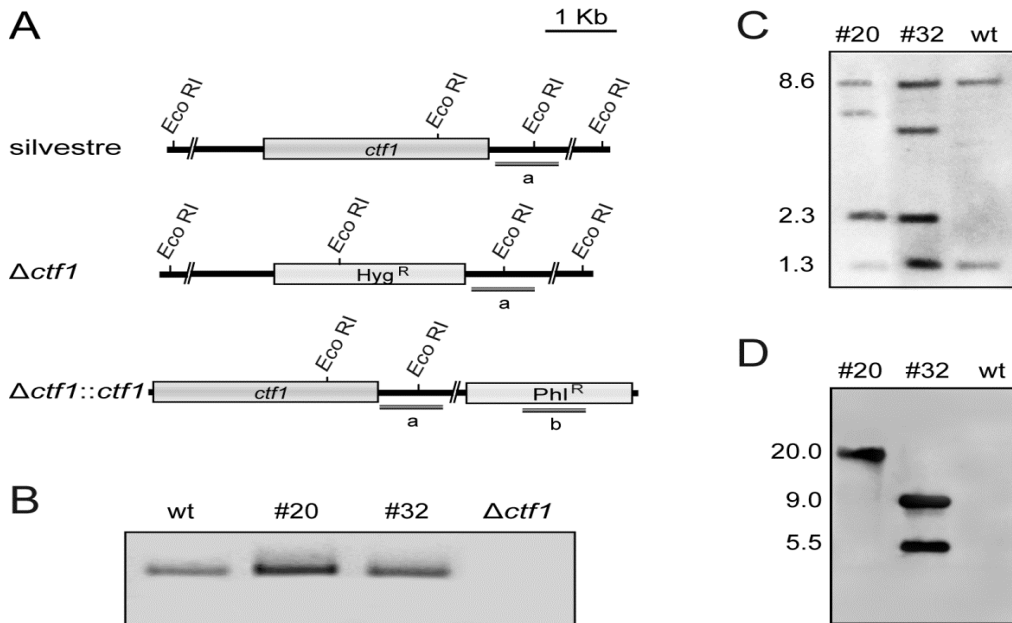


Figura 26. Complementación del mutante $\Delta ctf1$. **A** Estrategia de complementación mediante cotransformación con el alelo silvestre y el casete Phl^R como marcador. Las sondas usadas en la hibridación *Southern* se indican como "a" y "b". También se muestran los sitios *Eco* RI. **B-D** Comprobación de los transformantes #20 y #32, usando la estirpe silvestre (wt) y el mutante $\Delta ctf1$ como controles, mediante PCR con cebadores de la región codificante de *ctf1* (**B**); Análisis *Southern* tras tratamiento del ADNg con *Eco* RI usando la sonda "a" (**C**) o "b" (**D**). Los números indican tamaños en kb.

La figura 27 muestra una banda de amplificación en los transformantes obtenidos con el alelo *ctf2* tras realizar PCR con cebadores de la ORF de *ctf2*. Además, en el análisis *Southern* del ADNg tratado con *Hind* III e hibridado con sonda de la ORF (a) se observa una banda de 1.6 kb en los transformantes #7, #15 y #18, correspondiente a la ORF de *ctf2*, y adicionalmente otra de tamaño variable dependiendo del sitio de integración.

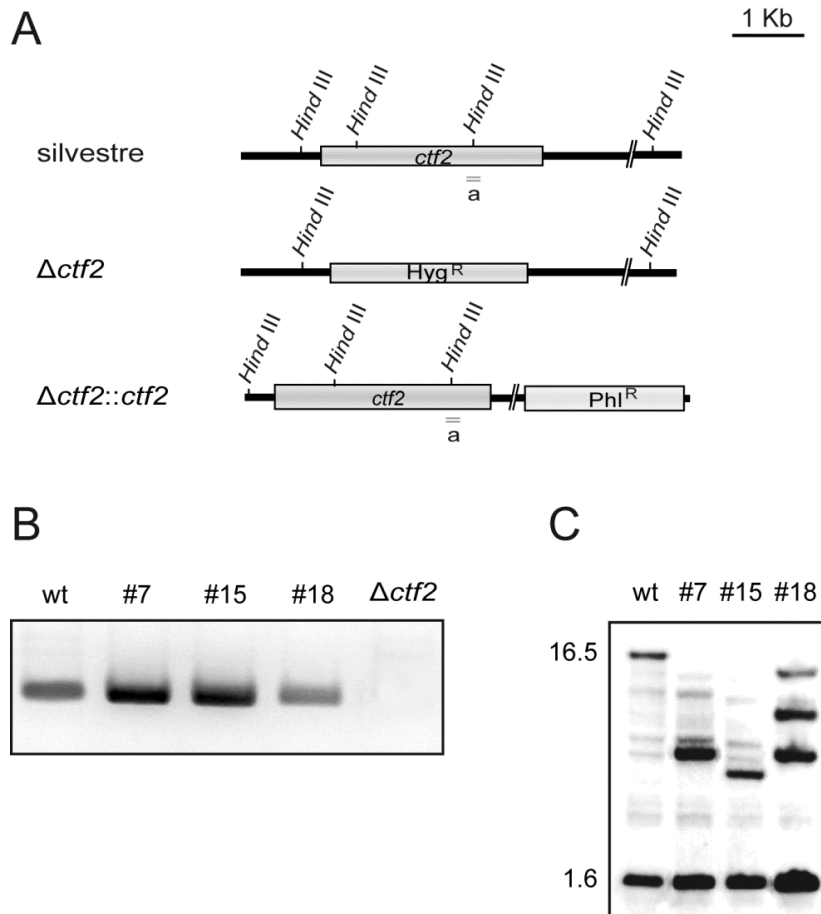


Figura 27. Complementación del mutante Δ *ctf2*. **A** Estrategia de complementación mediante cotransformación con el alelo silvestre y el casete Phi^{R} como marcador. La sonda usada en la hibridación *Southern* se indica como "a". También se muestran los sitios de restricción *Hind* III. **B-C** Comprobación de los transformantes #7, #15 y #18, usando la estirpe silvestre (wt) y el mutante Δ *ctf2* como controles, mediante PCR con cebadores de la región codificante de *ctf2* (**B**); Análisis *Southern* tras tratamiento del ADNg con *Hind* III usando la sonda "a" (**C**). Los números indican el tamaño en kb.

2.4. Caracterización de estirpes mutantes de *F. oxysporum* obtenidas en este trabajo.

2.4.1 Comportamiento patotípico de los mutantes en genes lipasas

Para determinar el papel de las distintas lipasas de *F. oxysporum* durante el proceso patogénico, se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate con los mutantes obtenidos en este trabajo (Figura 28). Las raíces de plántulas de tomate del cultivar *MoneyMaker* de 14 días de edad se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión con 5×10^6 esporas/ml de la estirpe silvestre, como control, de los mutantes sencillos $\Delta lip1$, $\Delta lip2$, $\Delta lip3$, $\Delta lip5$, $\Delta lip22$, $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$, del doble mutante $\Delta ctf1\Delta ctf2$, y de los complementados $\Delta ctf1::ctf1$ y $\Delta ctf2::ctf2$. Transcurrido ese tiempo, las plantas se sembraron en semilleros independientes con vermiculita como sustrato, evaluándose el desarrollo de la enfermedad durante las 2-3 semanas posteriores. El índice de enfermedad viene determinado por una escala que varía de 1 a 5, siendo 1 planta sana y 5 planta muerta (Huertas-González *et al.*, 1999) (Figura 28A), o bien por el porcentaje de supervivencia tras 35 días post-infección (López-Berges *et al.*, 2012) (Figura 28B). En cada ensayo se utilizaron 10 plantas por estirpe y se repitieron al menos tres veces con similares resultados.

La severidad de los síntomas de enfermedad en plantas infectadas con la estirpe silvestre aumentó a lo largo del experimento, estando muertas la mayoría tras 20 días de la inoculación. Asimismo, las plantas inoculadas con los mutantes $\Delta lip1$, $\Delta lip2$, $\Delta lip3$, $\Delta lip5$, $\Delta lip22$ mostraron un desarrollo de la enfermedad idéntico al silvestre (datos no mostrados). Por el contrario, las plantas inoculadas con la estirpes $\Delta ctf1$ mostraron un 40 % de supervivencia ($P < 0.0005$) tras 25 días, y $\Delta ctf2$, así como $\Delta ctf1\Delta ctf2$, un 80 % de supervivencia ($P < 0.0001$), aunque tras 35 días, el doble mutante seguía mostrando un 70 % de supervivencia por el 30 % mostrado por $\Delta ctf2$, evidenciando un fenotipo más severo. Por su parte, las estirpes complementadas recuperaron el fenotipo silvestre.

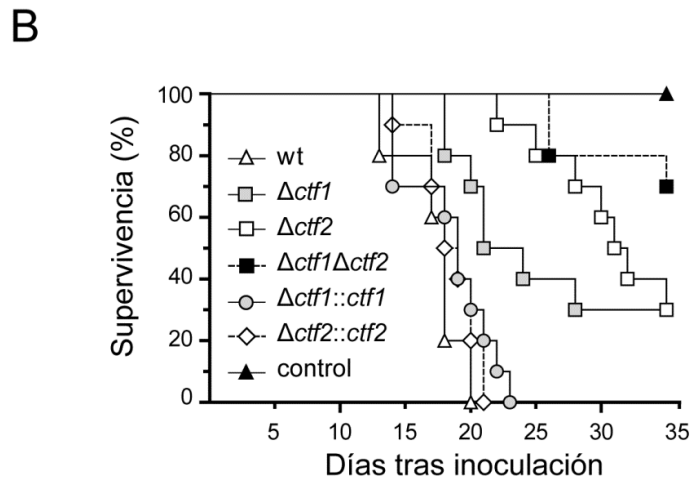
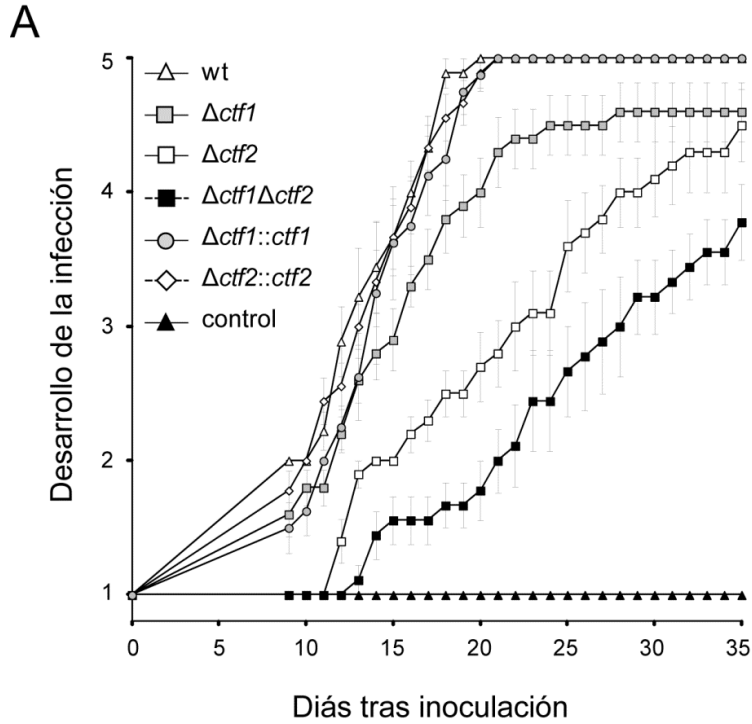


Figura 28. Representación gráfica de la incidencia de marchitez vascular en plantas de tomate (cv. Moneymaker) causada por la estirpe silvestre (wt), mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$, y complementados $\Delta ctf1::ctf1$ y $\Delta ctf2::ctf2$. Grupos de diez plantas fueron inoculadas y posteriormente plantadas en semilleros independientes. El índice de enfermedad viene determinado por: **A** Desarrollo de la infección, indicada por una escala donde 1 es planta sana y 5 es planta muerta, a lo largo de 35 días (Huertas-González *et al.*, 1999); **B** Índice de supervivencia a lo largo de 35 días. En todos los casos se utilizaron como control plantas no inoculadas. Todos los experimentos se llevaron a cabo al menos tres veces con resultados similares. Los datos mostrados se corresponden a un experimento representativo.

2.4.2 Determinación de la actividad lipasa total

Para determinar el efecto de la eliminación de los genes lipasas sobre la producción de enzimas lipolíticas extracelulares se analizó la actividad total, relativa a la estirpe silvestre, en sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos inducidos con WGO durante 18-20 horas (Figura 29). Entre los mutantes analizados, $\Delta lip1$ mostró una reducción del 20 % en relación al silvestre, mientras que $\Delta lip2$ y $\Delta lip5$ tenían reducida su actividad en un 10 %, y $\Delta lip3$ y $\Delta lip22$ no mostraron diferencias significativas. Los mutantes deficientes en alguno de los genes reguladores mostraron una reducción entre el 10 y el 30 % de la actividad total. Las estirpes complementadas recuperaron el fenotipo silvestre.

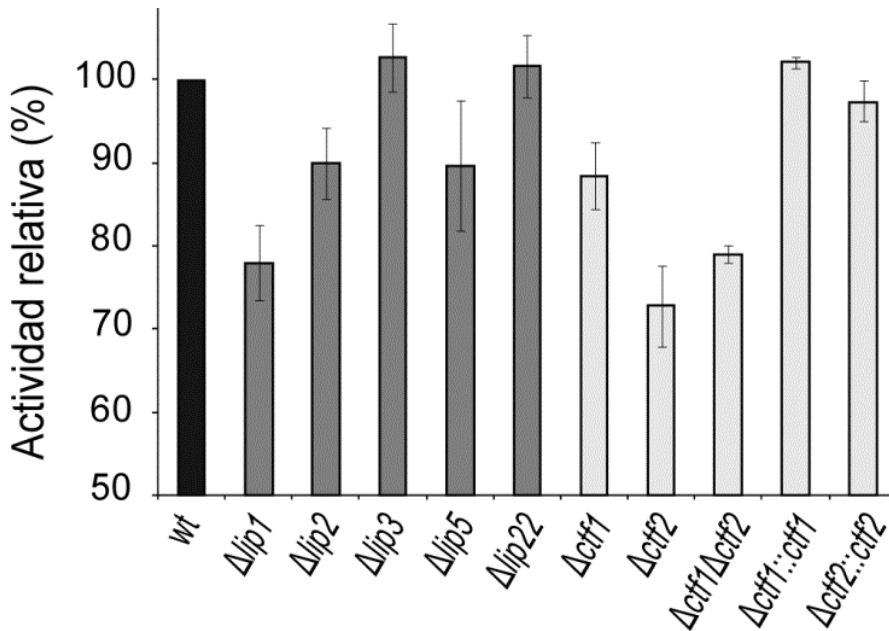


Figura 29. Actividad lipasa presente en sobrenadantes obtenidos de cultivos de los diferentes mutantes de *F. oxysporum* inducidos con WGO durante 18-20 horas. La actividad de las estirpes mutantes está referida como porcentaje a la observada en la estirpe silvestre. Las barras representan el error estándar calculado a partir de tres réplicas biológicas incluyendo cada una tres réplicas técnicas.

2.4.3 Acumulación del pigmento bikaverina tras inducción en WGO

Durante el crecimiento de *F. oxysporum* en WGO se observó una coloración rojiza en la capa lipídica del sobrenadante de algunos cultivos, excepto en los mutantes $\Delta lip1$, $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$, en los que permanecía el color amarillento original del WGO (Figura 30A). Como aproximación preliminar para determinar la causa de esta coloración, se midieron las absorbancias de dichas fracciones a longitudes de onda comprendidas entre 200-600 nm, observándose un pico máximo a 510 nm en las muestras rojizas, ausente en las amarillentas (Figura 30B). Para identificar la naturaleza química del pigmento, estas fracciones fueron analizadas por HPLC preparativo y por espectrometría de masas (MS). Mediante este análisis se determinó que el pigmento correspondía a un compuesto de peso molecular 383. Está descrito que *F. oxysporum* produce bikaverina, un pigmento no carotenoide de color rojo cuyo peso molecular coincide con el de las muestras ensayadas (Son *et al.*, 2008). Usando bikaverina como referencia (generosamente suministrada por el Prof. Javier Ávalos de la Universidad de Sevilla), se determinó que este pigmento era el responsable de la coloración rojiza de la fracción lipídica de los cultivos inducidos en WGO, y que los mutantes $\Delta lip1$, $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ no producían dicho pigmento (figura 30).

2.4.4 Utilización de ácidos grasos de cadena larga o corta como única fuente de carbono en los mutantes obtenidos

Para determinar el papel de los genes lipasas o de sus principales reguladores sobre la capacidad para metabolizar diferentes ácidos grasos, se analizó el crecimiento de los mutantes y del silvestre, en medio sólido sintético (SM) con diferentes ácidos grasos de cadena corta, de cadena larga, con una mezcla de ellos, o con glucosa y en medio no definido (PDA) como control. Los compuestos y sus concentraciones fueron: 1% Glucosa, 50 mM Acetato de Sodio, 2.5 mM Sodio Oleato, 10 mM Sodio Butirato, 0.5% (m/v) Glicerol triOleato, 0.5% (v/v) Glicerol triButirato, 0.5% (v/v) Glicerol triPalmitato, 2.5 mM Ácido Erúcico, 0.5% (v/v) Aceite de oliva o 0.5% (v/v) Aceite de germen de trigo (WGO).

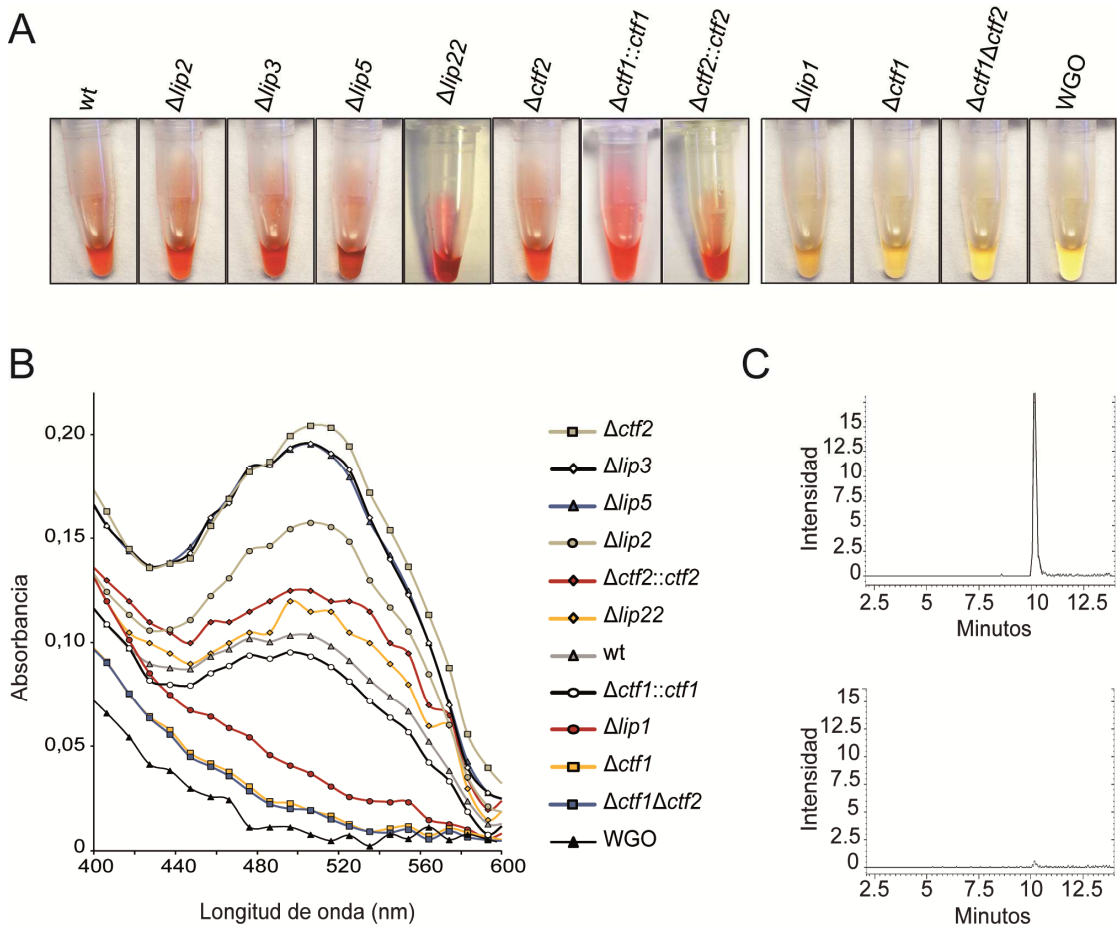


Figura 30. Análisis de los pigmentos producidos por las estirpes mutantes de genes lipasas de *F. oxysporum*. **A)** Imágenes de la capa de lípidos en los sobrenadantes de cultivos inducidos con WGO. **B)** Absorbancia de la fracción lipídica de cada estirpe a longitudes de onda comprendidas entre 400 y 600 nm. **C)** Cromatogramas HPLC-iónicos de la estirpe silvestre (panel superior) o del mutante $\Delta ctf1$ (panel inferior) usando bikaverina como referencia. Se representa el tiempo de retención desde que cada muestra se inyecta en el HPLC. Los cromatogramas del resto de los mutantes (no mostrados) fueron similares a la estirpe silvestre (los de color rojo) o al mutante $\Delta ctf1$ (el resto).

Las estirpes se incubaron durante 6 días a 28 °C. No se observaron diferencias significativas entre los mutantes afectados en lipasas estructurales en comparación con el silvestre (datos no mostrados). Por el contrario, los mutantes en genes reguladores mostraron en general menor crecimiento que el silvestre (Figura 31). El mutante $\Delta ctf1$ presentó una menor capacidad para metabolizar ácidos grasos de cadena larga (sodio oleato, glicerol trioleato, glicerol tripalmitato; y aceite de oliva y WGO, que contienen una mezcla de ácidos grasos). En el

mutante $\Delta ctf2$, el crecimiento estuvo reducido en ácidos grasos tanto de cadena corta como de cadena larga, observándose un fenotipo aditivo en el doble mutante $\Delta ctf1\Delta ctf2$. Por su parte, las estirpes complementadas recuperaron el fenotipo silvestre.

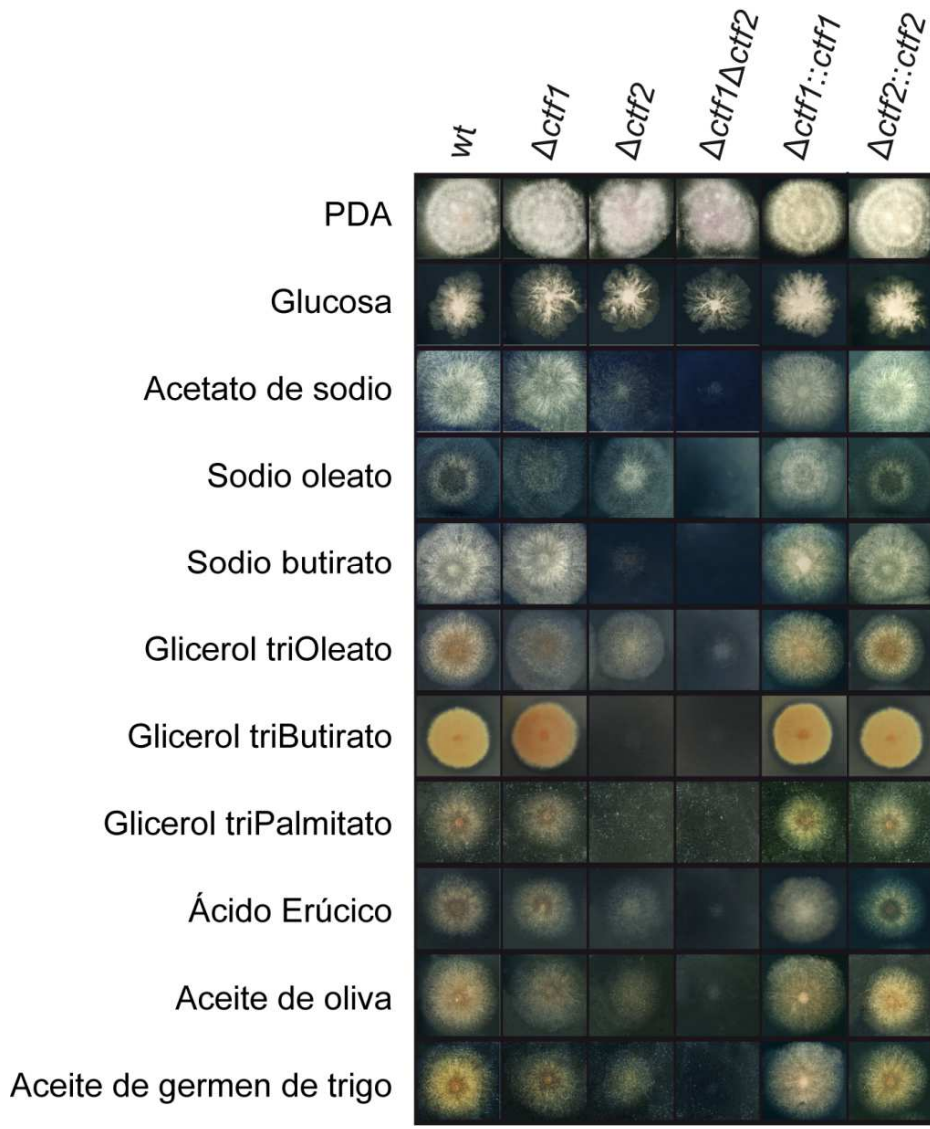


Figura 31. Colonias de la estirpe silvestre (wt), de mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ y de las estirpes complementadas $\Delta ctf1::ctf1$ y $\Delta ctf2::ctf2$ tras 6 días de crecimiento a 28 °C en medio SM sólido con los ácidos grasos indicados como única fuente de carbono. El medio completo PDA o medio SM con 1 % de glucosa fueron usados como control.

Por otra parte, en medio sintético (SM) con Glicerol triButirato como única fuente de carbono, se observó la aparición de un leve halo de hidrólisis en todos los casos como muestra visible de la capacidad del hongo de hidrolizar estos compuestos lipídicos, excepto en las estirpes incapaces de crecer.

2.4.5 Expresión relativa de genes lipasas estructurales en mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$, $\Delta ctf1\Delta ctf2$

Para investigar la regulación de los genes estructurales *lip1*, *lip1.2*, *lip2*, *lip3*, *lip4*, *lip5*, *lip10*, *lip11*, *lip13*, *lip15*, *lip20*, *lip21* y *lip22* se analizó su expresión mediante qRT-PCR, usando ADNc obtenido a partir del ARN extraído de cultivos en SM con 2% (v/v) de WGO a 28 °C (Figura 32). La eliminación dirigida de los reguladores Ctf1 o Ctf2 afectó a la expresión de varios genes. Se comprobó una regulación positiva de ambos factores de transcripción sobre siete de los genes estructurales, *lip1*, *lip2*, *lip3*, *lip10*, *lip13*, *lip15*, y *lip22*. Otros mostraron estar bajo regulación negativa del factor Ctf1, como *lip20* y *lip21* y *lip1.2* por ambos reguladores. El doble mutante mostró un fenotipo aditivo para la regulación de estos genes. La expresión de *lip4* y *lip5* resultó indetectable bajo las condiciones ensayadas (datos no mostrados). Las estirpes complementadas recuperaron siempre el fenotipo silvestre.

3. Discusión

La invasión de especies vegetales por patógenos fúngicos supone enormes pérdidas económicas a escala mundial, por ello la importancia del control de estas enfermedades. Para desarrollar métodos de control eficaces es necesario conocer los mecanismos que utilizan los patógenos para penetrar e invadir a sus hospedadores. Un enfoque para el estudio de la patogénesis fúngica ha sido la identificación de las enzimas extracelulares que puedan participar en la virulencia del patógeno. Durante el proceso de penetración y colonización, el hongo secreta una batería de enzimas, entre ellas las lipasas. El papel de enzimas lipolíticas durante la infección de patógenos que colonizan a la planta por la parte aérea ha sido descrito con anterioridad (Voigt *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2005; Paper *et al.*, 2007, Nguyen *et al.*, 2010a), sin embargo no se ha investigado hasta el momento en patógenos de suelo. Para determinar su papel en la virulencia del patógeno de suelo *F. oxysporum*, en este estudio se ha caracterizado

genética y bioquímicamente el sistema lipolítico, incluyendo la delección dirigida de cinco genes de lipasas estructurales secretadas y dos genes reguladores de lipasas.

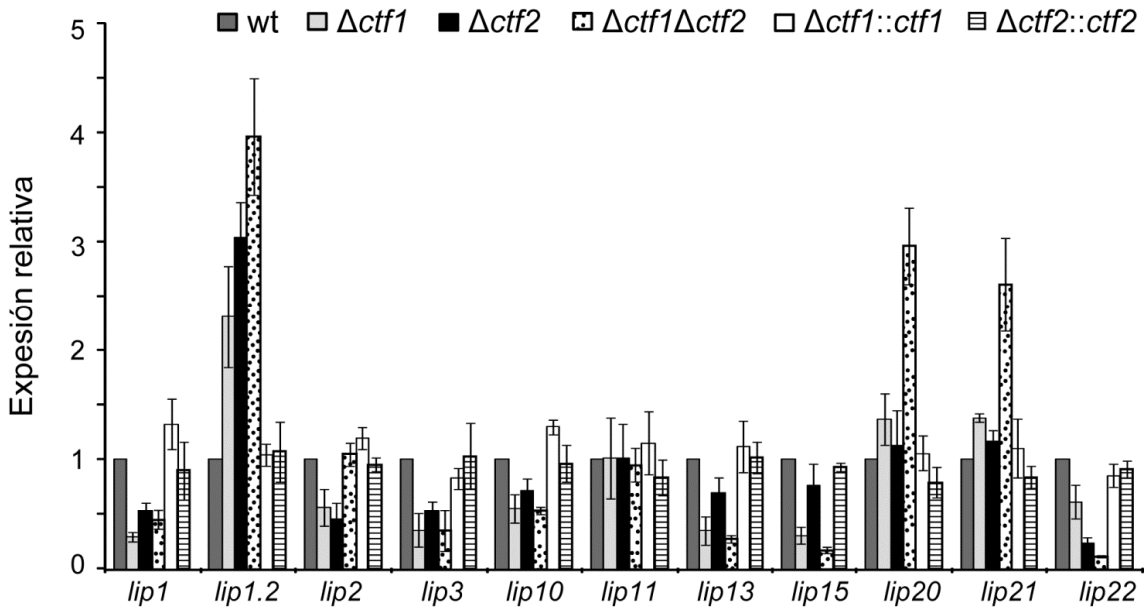


Figura 32. Expresión de genes lipasas mediante qRT-PCR en los mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$, $\Delta ctf1\Delta ctf2$ y en las estirpes complementadas $\Delta ctf1::ctf1$ y $\Delta ctf2::ctf2$ tras crecimiento en condiciones de inducción con aceite de germen de trigo, en referencia a la estirpe silvestre (wt). Las barras representan el error estándar calculado de tres replicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada una.

3.1. F. oxysporum contiene un sistema lipolítico versátil y diverso

En este trabajo se han identificado 24 genes presumiblemente responsables de otras tantas lipasas secretadas que están relacionadas filogenéticamente con Lip1 (Martínez-Rocha *et al.*, 2008) mediante el análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum*. Todas ellas presentan el pentapéptido GxSxG, conservado en lipasas, por ejemplo en las lipasas *FGL1-FGL5* y *LIP1* de *F. graminearum* (Voigt *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2010). La serina de este dominio forma parte de la triada catalítica Serina-Ácido-Histidina (Winkler *et al.*, 1990; Lowe, 1992; Cambillau y Tilveurgh, 1993; Pleiss *et al.*, 1998; Nardini y Dijkstra, 1999; Pleiss *et al.*, 2000). Aunque las lipasas muestran características comunes, como una estructura proteica

similar y una maquinaria catalítica idéntica, poseen secuencias de aminoácidos variables (Fischer & Pleiss, 2003). En su extremo N-terminal existe un péptido señal para la secreción.

Nuestra búsqueda *in silico* reveló mayor número de lipasas en el genoma de *F. oxysporum* que en especies cercanas como *F. graminearum* y *F. verticillioides*, como se ha descrito para otras familias génicas del género (Ma *et al.*, 2010). La diferencia en el número de lipasas entre las tres especies de *Fusarium* puede deberse a mecanismos evolutivos divergentes durante la adaptación del proceso de infección de la raíz o de la parte aérea de la planta. En patógenos de suelo, la aparente redundancia de enzimas lipolíticas podría haber evolucionado de un ancestro común por duplicación génica para mejorar su adaptación asociada a la especificidad de requerimientos necesarios durante la penetración del hospedador. Diferencias similares se han descrito en cutinasas; *F. oxysporum* contiene un único gen cutinasa (Martínez-Rocha *et al.*, 2008) en contraposición a los tres identificados en *F. solani* (Li *et al.*, 2002). El análisis filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos de las 25 lipasas de *F. oxysporum* revelaron cuatro clados, según los datos obtenidos en el NCBI, incluyendo esterasas/lipasas, lipasas clase III, lipasas secretadas y una prolil-oligopeptidasa (Figura 14). Las características básicas que definen a las lipasas son: una triada catalítica, la activación interfásica, la presencia de una tapadera, y la capacidad de hidrolizar triacilglicerol insolubles de cadena larga (TAGs). Sin embargo, ninguna de estas cuatro propiedades pueden aplicarse como criterio de clasificación definitivo, al existir numerosas lipasas que no cumplen algunas de estas propiedades, como por ejemplo, las de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993) y las de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994a; Uppenberg *et al.*, 1994b) que no muestran activación interfásica. El comité de nomenclatura de la unión internacional de bioquímica (IUB) clasifica las hidrolasas de acuerdo con los sustratos que reconocen. Así, el término lipasa se refiere comúnmente a triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), sin embargo, existen muchas enzimas capaces de hidrolizar una variedad de sustratos éster, como por ejemplo las fosfolipasas, esterasas, cutinasas, amidasas, etc. todas ellas englobadas en el grupo de las carboxil ester hidrolasas (EC 3.1.1.-) lo que hace la clasificación arbitraria y confusa (Schmid and Verger, 1998). Tanto las esterasas, como las cutinasas y las lipasas presentan estructuras y funciones similares, con un mecanismo enzimático común, considerándose a las cutinasas como el intermedio entre lipasas y esterasas (Chahinian *et al.*, 2002; Nini *et al.*, 2001; Pleiss *et al.*, 1998). De manera general las lipasas hidrolizan TAGs insolubles, de cadena media o larga, como la tricotanoina y la trioleina, aunque también son activas frente a ésteres solubles de cadena corta. Por su parte, las esterasas actúan sobre ésteres solubles de cadena corta, como el butirato y la

triacetina, difícilmente hidrolizados por lipasas. Aunque algunas lipasas pueden actuar sobre ésteres solubles de cadena corta, no se han descrito esterasas que hidrolizan ésteres insolubles de cadena larga (Chahinian *et al.*, 2002). En consecuencia, se considera a las lipasas como carboxil éster hidrolasas con capacidad de actuar sobre TAGs de cadena larga en presencia de una interfase lípido-agua (Schmid and Verger, 1998). No obstante, existen excepciones como una cutinasa de *F. solani* capaz de hidrolizar triacilgliceroles tanto de cadena larga como corta (Mannesse *et al.*, 1995). La identificación de una supuesta peptidasa en nuestra búsqueda, probablemente se deba a las analogías existentes entre carboxil éster hidrolasas y peptidasas como la estructura común de la α/β -hidrolasa plegada; la presencia de un hueco oxianión; o la similitud estructural entre el enlace amido y éster (Derewenda & Sharp, 1993; Schrag & Cygler, 1997).

Además de su importancia en biotecnología, las lipasas son consideradas como posibles factores de virulencia en bacterias y hongos. Se ha descrito la inducción de lipasas durante el ciclo infeccioso en especies patógenas como *C. albicans*, donde contribuyen a la virulencia sobre tejidos humanos (Hube *et al.*, 2000), en *Alternaria brassicicola*, donde una lipasa interviene en estadios tempranos de la patogénesis (Berto *et al.*, 1997; Berto *et al.* 1999), en *Burkholderia glumae*, donde la infección de plantas de arroz parece regulada por una lipasa extracelular (Devescovi *et al.*, 2007) o en *F. graminearum*, donde hay varias lipasas esenciales para la patogénesis (Voight *et al.* 2005; Nguyen 2010a, Nguyen 2010b). La existencia del amplio perfil lipolítico que presenta *F. oxysporum* puede ser reflejo de la diversidad de funciones potenciales para la adquisición de nutrientes o durante la infección y colonización de la planta (Christensen y Kolomiets, 2010; Meer-Janssen *et al.*, 2010; Singh y Del Poeta, 2010).

Hasta la fecha existen escasos ejemplos de mutantes en genes únicos responsables de enzimas líticas que hayan mostrado un patrón de virulencia reducido o la pérdida completa de patogenicidad. Estos resultados se explicarían por la redundancia funcional existente en este tipo de proteínas, por ello la anulación simultánea de un conjunto de genes resultaría de gran utilidad para determinar la implicación de enzimas con funciones similares en patogénesis (Walton, 1994). Ello ha inducido nuestra búsqueda en el genoma de *F. oxysporum* de factores de transcripción potencialmente capaces de regular la síntesis de hidrolasas y entre ellas de lipasas. Además del gen *ctf1* previamente descrito en *F. oxysporum* (Martínez-Rocha *et al.*, 2008), en el presente estudio se ha identificado un segundo gen, *ctf2*, también presunto regulador de la actividad lipasa. Ambos genes presentan identidad a factores de transcripción que regulan el metabolismo de ácido grasos en *A. nidulans* (FarA y FarB) (Hynes *et al.*, 2006) o la actividad

cutinolítica en *F. solani* (Ctf α y Ctf β) (Li and Kolattukudy, 1997; Li *et al.*, 2002) (Figura 15). Las dos proteínas presuntas reguladoras de lipasas en *F. oxysporum* contienen una región de localización nuclear, y el dominio de unión a ADN con el motivo conservado CX₂CX₆CX_nCX₂CX₆-₈C en su extremo amino terminal, típico de proteínas Zn₂(II)Cys₆ que regulan diversas funciones. En Ctf1 y Ctf2, el motivo conservado varía ligeramente en la distancia entre la tercera y la cuarta cisteína, ya que cuentan con 8 y 7 residuos respectivamente, lo que podría indicar diferencias en la especificidad de unión a los promotores. Como se ha descrito previamente (Hynes *et al.*, 2006), dichas proteínas están muy conservadas en hongos filamentosos, organizándose en dos clados, uno que incluye los ortólogos a Ctf1 y otro los ortólogos a Ctf2. Ambos grupos muestran elevada identidad entre sí, especialmente en la región del dominio de unión al ADN. El elevado número de lipasas identificadas, y la presencia de dos reguladores indica la complejidad del sistema lipolítico en *F. oxysporum*.

3.2. Los promotores de genes lipasas son reconocidos por los factores transcripcionales Ctf1 y Ctf2.

Este grupo de factores de transcripción se unen a la región promotora por el dominio de unión al ADN reconociendo dos tripletes palindrómicos GCC(N)GGC, donde N puede tener longitud variable. En *F. solani*, los motivos del ADN reconocidos por Ctf α tienen una posición opuesta y están separados por dos nucleótidos (GCCN₂GGC) (Li *et al.*, 2002), mientras que en *A. nidulans*, FarA y FarB se unen al motivo conservado CCGAGG (Hynes *et al.*, 2006). En este mismo grupo se ha descrito previamente que el promotor del gen *ctf1* de *F. oxysporum* contiene una copia del motivo CCGAGG, sugiriendo que Ctf1 se podría autoregular (Martínez-Rocha *et al.*, 2008), o estar regulado por Ctf2. Las regiones promotoras de 24 lipasas identificadas en *F. oxysporum* contienen el motivo CGG(N)CCG similar al reconocido por CTF α de *F. solani* (Tabla 14), además de elementos CCGAGG localizados en el promotor de 13 lipasas estructurales, entre ellas *lip1* (Martínez-Rocha *et al.*, 2008) (Tabla 15).

3.3. El sistema lipolítico de *F. oxysporum* en la utilización de ácidos grasos y en patogénesis

Los resultados presentados demuestran que la actividad lipolítica de *F. oxysporum* es inducible por sustratos lipídicos como aceite de germen de trigo (WGO), debido presumiblemente

a la secreción de una batería de lipasas con perfiles físico químicos diferentes. En este trabajo se describe que el 75 % de la actividad se debe fundamentalmente a proteínas de bajo punto isoeléctrico (Figura 16). Como primera aproximación sobre el papel de las lipasas en la infección de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, se realizaron ensayos de expresión mediante qRT-PCR de genes estructurales para detectar transcritos específicos en raíces y tallos de plantas de tomate a lo largo del tiempo tras la infección (Figura 17). Se observaron tres respuestas diferentes: genes con una expresión relativamente alta durante la infección de plantas, que incluyen *lip1*, *lip3* y *lip22*; un segundo grupo con niveles de expresión muy bajos, pero detectables, que incluyen *lip1.2*, *lip2*, *lip10*, *lip13* y *lip21*; y el resto de los genes, *lip4*, *lip5*, *lip11*, *lip15* y *lip20*, cuya expresión no fue detectable. Los transcritos analizados son detectables *in planta* con picos de expresión máxima variables según el gen, lo que sugiere que la diversidad de lipasas secretadas podrían jugar papeles diferentes durante la adquisición de nutrientes y la colonización de la planta de tomate.

Para determinar el papel de las lipasas en la patogenicidad de *F. oxysporum* se delecionaron individualmente los genes de cinco lipasas estructurales, *lip1*, *lip2*, *lip3*, *lip5* y *lip22*, incluyendo aquellos con mayor expresión durante la infección y los ortólogos de *F. graminearum* que habían mostrado ser esenciales en patogénesis (Voight et al 2005; Nguyen 2010a), además de los dos reguladores, *ctf1* y *ctf2*. Previamente se había obtenido un mutante *ctf1* con pérdida de función en nuestro laboratorio (Martínez-Rocha et al., 2008). La delección completa del gen en el presente estudio ha mostrado fenotipos similares a los descritos.

3.3.1 El complejo lipolítico de *F. oxysporum* es necesario para la utilización de ácidos grasos

La delección de la mayoría de las lipasas estructurales y en particular de los genes reguladores resultó en una reducción significativa de la actividad lipasa total (entre 10-30 %), mostrando en el doble mutante $\Delta ctf1\Delta ctf2$ un efecto aditivo (Figura 29). Estos resultados demuestran que los genes reguladores son necesarios para la expresión de genes involucrados en la hidrólisis de ácidos grasos, y que su delección afecta a la actividad total.

En nuestros ensayos, únicamente los mutantes $\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ y el doble $\Delta ctf1\Delta ctf2$ estaban afectados en el metabolismo de ácidos grasos (Figura 31). Por el contrario, los mutantes estructurales no mostraron diferencias detectables en comparación con la estirpe silvestre. La

deficiencia en *ctf1* afectaba al metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, según la apariencia menos densa de su micelio cuando se crece en medio sólido conteniendo como única fuente de carbono estos compuestos. Sin embargo la delección de *ctf2* afectó severamente al metabolismo de ácidos grasos de cadena corta, y moderadamente a los de cadena larga, observándose en el doble mutante un fenotipo aditivo. Esto podría indicar que Ctf1 afecta a la expresión de lipasas, las únicas esterasas que degradan ácidos grasos de cadena larga. Por el contrario Ctf2 podría regular un conjunto más amplio de genes con capacidad de hidrolizar ésteres de cadena larga o corta, entre las que se encuentran cutinasas y esterasas, además de lipasas. La presencia en el promotor de *ctf1* de una región de reconocimiento para este factor de transcripción (CCGAGG), sugiere que Ctf2 podría ser un regulador positivo para Ctf1 lo que explicaría el fenotipo más acusado en el mutante $\Delta ctf2$. No obstante, el fenotipo aditivo mostrado por el doble mutante indica que ambos factores regulan diferentes genes. Estos resultados difieren de los descritos en *A. nidulans*, donde la delección de *farA* (ortólogo a *ctf1*) afectaba a la utilización de ácidos grasos de cadena corta o larga, mientras que la delección de *farB* (ortólogo a *ctf2*) afectaba a los de cadena corta (Hynes *et al.*, 2006). Esto sugiere que factores de transcripción similares juegan papeles diferentes en la regulación del metabolismo de ácidos grasos en distintas especies fúngicas.

La expresión génica, analizada mediante qRT-PCR, en distintas estirpes inducidas en WGO mostraron que Ctf1 y Ctf2, activan la transcripción de los genes lipasas *lip2*, *lip3*, *lip10*, *lip13*, *lip15* y *lip22*, además de regular positivamente a *lip1* como se había descrito (Martínez-Rocha *et al.*, 2008). Por otro lado, Ctf1 parece regular negativamente a *lip1.2*, *lip20* y *lip21*, mientras que Ctf2 regula negativamente a *lip1.2*. Como era esperable, el doble mutante mostró un fenotipo aditivo para la regulación génica (Figura 32). Estos resultados demuestran la compleja regulación transcripcional de las lipasas extracelulares por Ctf1 y Ctf2 durante el crecimiento *in vitro*. No obstante, el papel regulador de Ctf1 y Ctf2 podría ser distinto durante la infección de plantas como se ha descrito en la regulación de Lip1 por Ctf1 (Martínez-Rocha *et al.*, 2008).

3.3.2 Lip1 está involucrado en la síntesis de bikaverina

La detección visual de un pigmento rojo, identificado como bikaverina, en la fracción lipídica de los sobrenadantes de cultivos inducidos con WGO mostraron claras diferencias entre los mutantes $\Delta lip1$, $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ en comparación a la estirpe silvestre (Figura 30). Estos

resultados son consistentes con la hipótesis de que Lip1 está implicado en el metabolismo del WGO, deduciéndose que la producción de intermediarios tras la hidrólisis de los ácidos grasos constituyentes del WGO son esenciales para la biosíntesis de bikaverina, y que la incapacidad de ser metabolizados por Lip1 influye en la síntesis del compuesto. La regulación de Lip1 por Ctf1 explica que los mutantes $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$ presenten el mismo fenotipo. La biosíntesis de bikaverina, frecuente en especies de *Fusarium* pero no habitual en otros hongos, involucra a seis genes muy conservados entre especies. Se ha descrito que la producción de bikaverina está regulada por mecanismos diversos (nitrógeno, fosfato, sulfato, calcio, sacarosa, pH, aireación apropiada, etc.) (Limon *et al.*, 2010), pero no se ha identificado la relación entre el metabolismo de lípidos y la síntesis del pigmento. Por este motivo, la ausencia de bikaverina en los mutantes deficientes en Lip1, se interpreta como un efecto indirecto, afectando la ausencia de la lipasa a algún mecanismo de regulación que provoca la ausencia del pigmento. Un ejemplo de regulación indirecta se ha descrito en los genes de la biosíntesis de bikaverina del mutante $\Delta Fvel1$ (relacionado con el complejo velvet) de *Fusarium fujikuroi*, al detectarse un incremento de bikaverina. La complejidad de la regulación de bikaverina en respuesta a señales externas sugiere que la de-represión de genes es un efecto secundario de los cambios en la transmisión y reconocimiento de señales ambientales provocados por la delección de *Fvel1* (Wiemann *et al.*, 2010; Wiemann *et al.*, 2009).

3.3.3 La utilización de ácidos grasos es necesaria para el desarrollo de la infección.

Nuestros resultados demuestran que los genes lipasas no son necesarios individualmente para la virulencia del hongo. Esto contrasta con lo descrito en *F. graminearum* donde la delección de *FGL1*, *FGL2* o *FGL5* causa una severa reducción de la virulencia (Voigt *et al.*, 2005; Nguyen 2010a), posiblemente debido a la importancia de estas enzimas para la colonización de las regiones aéreas de la planta por *F. graminearum*. No obstante, la interrupción de *LIP1* en *F. graminearum* mostraba reducción en la actividad lipasa, aunque no era esencial para la patogenicidad (Feng *et al.*, 2005). Aunque no se han encontrado evidencias de la involucración de lipasas individuales en la virulencia de *F. oxysporum*, su función para la adquisición de nutrientes resultó importante. Es probable que las lipasas secretadas sean necesarias para la utilización de lípidos, ya que la anulación de casi cualquier gen reduce la actividad lipolítica. Por otra parte, las lipasas individuales pueden resultar dispensables debido al

aumento en la expresión de otras lipasas extracelulares, fenómeno conocido como compensación de la expresión génica. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que la virulencia esté ligeramente reducida en el mutante *ctf1* y severamente en el mutante *ctf2*, mostrando el doble mutante un fenotipo aditivo (Figura 28). La aparente discrepancia entre el fenotipo del mutante *ctf1* obtenido en este estudio y el mutante del mismo gen previamente obtenido (Martínez Rocha *et al.*, 2008), que no mostraba alteración del patotipo, podría deberse al fondo genético de los cultivares de plantas de tomate usados en ambos casos (cv. Vemar, previamente usado o cv. Moneymaker, usado en este estudio). Nuestros resultados muestran que la regulación conjunta de varios genes lipasas afectan a la patogenicidad de *F. oxysporum*. No obstante, no se descarta la posibilidad de que el fenotipo de los mutantes $\Delta ctf1$ y $\Delta ctf2$ se deba a la regulación de otros genes y no estrictamente a las enzimas líticas secretadas. En *A. nidulans* se han descrito genes cuyos promotores presentan la secuencia CCTCGG, como dianas potenciales para estos factores de transcripción. La mayoría están involucrados en el metabolismo de lípidos, como por ejemplo genes de la biogénesis o el funcionamiento de los peroxisomas, genes de β -oxidación o en el transporte de acetil-CoA entre peroxisomas y mitocondrias (*acuJ* y *acuH*); pero otros están implicados en el transporte de metabolitos o en estrés oxidativo (peroxisomas) (Hynes *et al.*, 2006). Se han descrito varios casos en los que la alteración del metabolismo de lípidos afecta a la patogénesis, como en *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001), donde se ha relacionado el ciclo del glioxilato con su virulencia, en el hongo *M. grisea* donde se ha determinado la importancia de la β -oxidación peroxisomal de lípidos en la formación del apresorio (Wang *et al.*, 2007) o en *Cryptoococcus neoformans*, donde se ha demostrado que el metabolismo de lípidos juega un papel importante en la regulación de la patogénesis (Shea & Del Poeta, 2006). Además se ha descrito que estos factores de transcripción pueden interactuar con otras proteínas o incluso con el ARN (MacPherson *et al.*, 2006). Sin embargo, la correlación directa entre la imposibilidad de metabolizar ácidos grasos con la reducción de virulencia queda manifiesta, ya que la incapacidad de crecer en ácidos grasos en los mutantes reguladores ($\Delta ctf1$, $\Delta ctf2$ y $\Delta ctf1\Delta ctf2$) tuvo como resultado el retraso en el proceso de patogénesis.

CAPÍTULO 2

Poligalacturonasas (PGs) estructurales de *F. oxysporum*

1. Introducción

Las enzimas que degradan la pectina de la pared celular de plantas se consideran determinantes de la patogenicidad desde hace tiempo, por su papel en la penetración del hospedador (Reid, 1950) y se han estudiado con más detalle que otras CWDEs (Walton, 1994). De acuerdo con su mecanismo catalítico, las enzimas que degradan se dividen en endo- y exopoligalacturonasas (PGs), aunque algunas muestran ambas actividades (Cooper y Rankin, 1978), endo- y exo-pectato liasas y pectin metilesterasas. Las PGs son las pectinasas mejor conocidas debido a su inducción masiva por sustratos pécticos y su habilidad para macerar los tejidos vegetales (Collmer y Keen, 1986).

1.1 Estructura de la pectina

En plantas superiores, las células están rodeadas por la pared, una red heterogénea de polímeros, principalmente celulosa, xiloglucano, pectina y proteínas estructurales. En ella, las microfibras de celulosa están recubiertas por xiloglucanos e incrustadas en varias capas de polisacáridos pécticos, formando la lamela media (Di Pietro *et al.*, 2009) (Figura 33). Además de aportar un soporte estructural, la pared vegetal constituye una línea de defensa frente a patógenos.

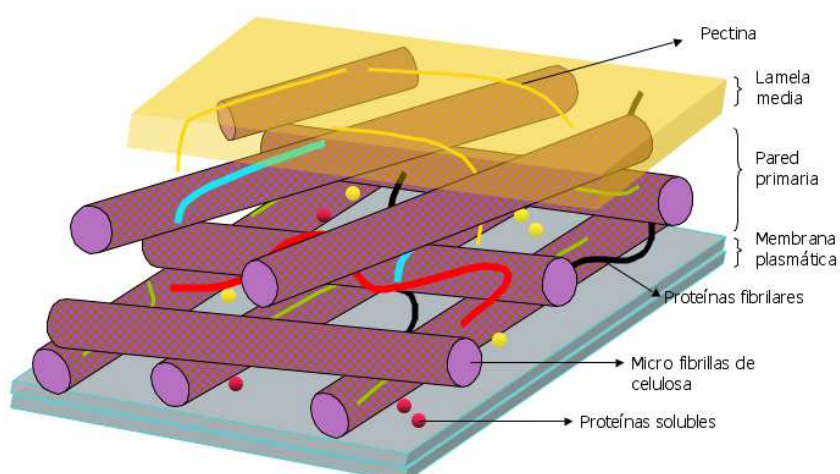


Figura 33. Esquema de la estructura de la pared celular.

Las moléculas de pectina están compuestas por diferentes regiones estructurales (Carpita & Gibeaut, 1993; Mutter et al, 1996; Quemener et al, 2003). La denominada región lisa, constituida por homogalacturonano (HG), un polímero lineal formado por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 que pueden encontrarse acetilado y/o metil-esterificado. La región ramnogalacturonano I (RGI) constituida por disacáridos de ramnosa - ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α -1,2 y α -1,4, respectivamente. En esta región, ambos tipos de residuos pueden llevar cadenas laterales de azúcares neutros como galactosa, arabinosa y xilosa, entre otros. Por último una región RGII consistente en un esqueleto de homogalacturonano con cadenas laterales complejas unidas a los residuos de ácido galacturónico (Willats et al, 2006). Las cadenas RG también se denominan regiones vellosas de la pectina. Se ha postulado que la región HG forma el esqueleto estructural de la molécula a partir del cual se ramifican las regiones RG. No obstante Vincken y colaboradores han propuesto un modelo donde el esqueleto lo forma la región RGI a partir del cual, las regiones HG y RGII forman largas cadenas (Vincken et al, 2003) (Figura 34).

1.2 PGs de hongos

Las endoPGs (endo- α 1,4-poligalacturonasas; E.C. 3.2.1.15) y las exoPGs (exo- α 1,4-poligalacturonasas; E.C. 3.2.1.67) degradan la pectina mediante la adición de moléculas de agua para romper los enlaces α -1,4 de los residuos de ácido D-galacturónico. Esto hace que la región HG de la pectina sea el sustrato ideal para estas enzimas, degradándose en ácido tri-, di- y monogalacturónico como producto final, con la formación de oligogalacturónicos como producto intermediarios (Di Pietro *et al.*, 2010). Las endoPGs rompen el esqueleto de homogalacturonano internamente, mientras que exoPGs progresivamente hidrolizan monómeros del extremo no reducido.

1.2.1 Estructura

La estructura de las PGs es bien conocida por numerosos cristalográficos (Abbott & Boraston, 2007; Abbott & Boraston, 2008; Bonivento et al, 2008; Cho et al, 2001; Pickersgill et al, 1998; Pijning et al, 2009; van Pouderooyen et al, 2003; van Santen et al, 1999). Todas ellas muestran una hélice beta paralela dextrógira (Yoder et al, 1993), formada por 10 colas con 3 o 4 láminas β repetidas en tándem. El sitio activo se localiza en una hendidura profunda y contiene

puentes disulfuro que contribuyen a su estabilización (Federici et al, 2001; Herron et al, 2000; Jenkins & Pickersgill, 2001); el hueco del sitio activo está abierto en ambos lados en las endoPGs o cerrado en uno en las exoPGs (Abbott y Boraston, 2007) (Figura 35). En base a su secuencia y a la estructura de su centro catalítico, las PGs se han clasificado dentro de la familia hidrolasa 28 (GH28), junto a las ramnogalacturonas (Henrissat & Davies, 1997).

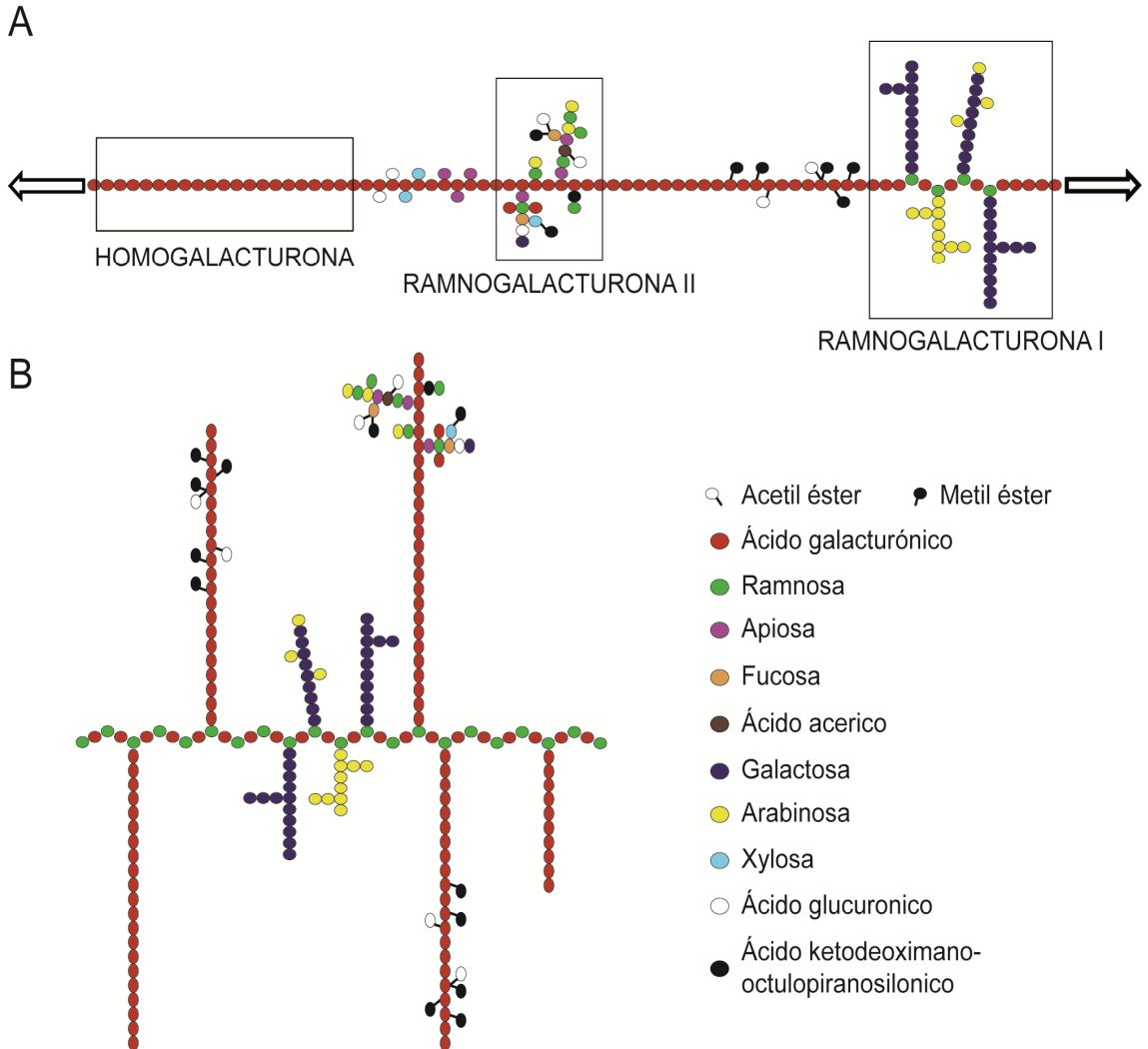


Figura 34. Estructura de la pectina. Representación esquemática de la estructura convencional (**A**) y la propuesta recientemente (**B**) (Willats *et al.*, 2006).

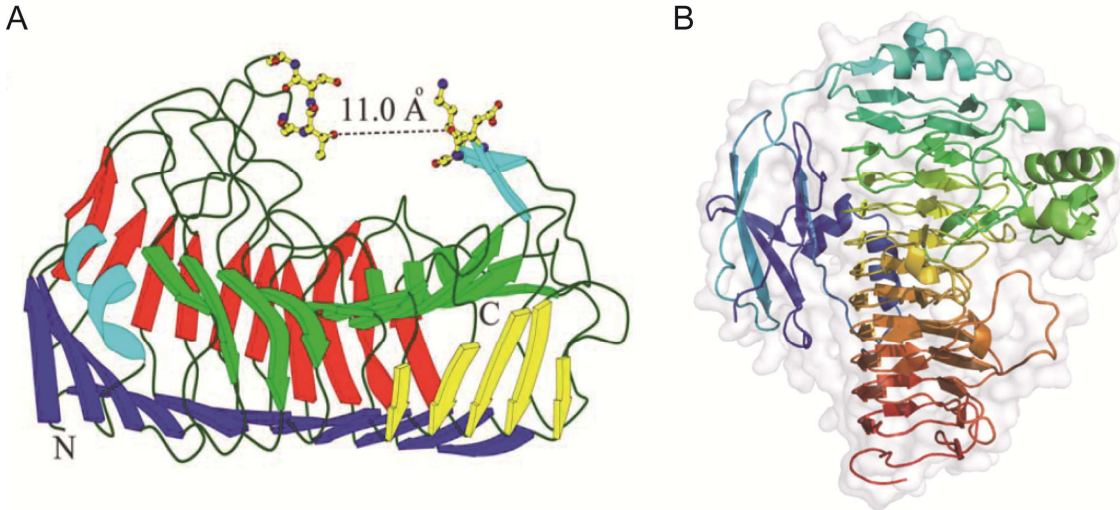


Figura 35. Esquema de la estructura de **A** endoPG I de *A. niger* (Van pouderoyen *et al.*, 2003) y **B** exoPG YeGH28 de *Yersinia enterocolitica* (Abbot y Boraston, 2007).

1.2.2 Regiones conservadas

Trabajos comparativos de PGs fúngicas han permitido determinar en ellas varios dominios conservados. Así, las secuencias de aminoácidos Asn-X-Asp (NXD), Asp-Asp (DD), Gly-His-Gli-X-Ser-Ile-Gly-Ser (GHGXSIGS) y Arg-Ile-Lys (RIK) son comunes en PGs (Caprari *et al.*, 1993b; Kitamoto *et al.*, 1993; Reymond *et al.*, 1994). Mediante mutagénesis dirigida del gen *pgA* de *F. moniliforme* se ha determinado la importancia en la catálisis enzimática de la Histidina y las Serinas de la región GHGXSIGS (Caprari *et al.*, 1996); del mismo modo, se ha demostrado que los tres residuos de Ácido aspártico (de las regiones NXD y DD) y las Arginina y Lisina de la región RIK, que intervienen en la unión al sustrato, son esenciales para su funcionalidad (van Santen *et al.*, 1999). Además la modificación química de un residuo de tirosina (Y), altamente conservado, en la endopoligalacturonasa Pg2 de *A. niger* evidenció su papel fundamental en la catálisis (Stratilova *et al.*, 1996).

1.2.3 Regulación e inducción

Las pectinasas extracelulares se inducen en presencia de materiales pécticos en el medio de cultivo (Riou *et al.*, 1992). En general, las PGs son inducidas por pectina, ácido poligalacturónico y productos finales del metabolismo del sustrato; por otra parte están

reprimidas por la presencia de fuentes de carbono como la glucosa (Annis & Goodwin, 1997) en muchos casos relacionadas con CreA, un represor que actúa en presencia de carbono, como se ha observado en *A. nidulans* (de Vries et al, 2002; Lockington et al, 2002). También el factor ccSNF1, necesario para la expresión de genes sometidos a represión catabólica, está relacionado con la inducción de las enzimas pécticas en *C. carbonum* (Tonukari et al, 2000). Aún así, el carácter inducible de estos genes no siempre es cierto, ya que también se han descrito casos en los que los genes de PG se expresan de forma constitutiva (Wubben et al, 1999). Existen también ejemplos de algunas PGs en los que no existe la represión catabólica detectándose inducción en medios con glucosa, como el gen *bcpG3* de *B. cinerea* (Wubben, et al., 1999) y el *pg1* de *Penicillium olsonii* (Wubben et al, 2000). No obstante, se han determinado diferencias entre la capacidad de inducción del ácido poligalacturónico y de la pectina lo que podría deberse a sus diferentes grados de metilación o al pH.

La regulación mediante pH se ha determinado en *F. oxysporum*, donde el mutante de *pacC*, gen relacionado con la regulación por pH, expresa una gran cantidad de endoPGs y además de ser más virulento; por el contrario, el mutante constitutivo exhibe el fenotipo contrario (Caracuel et al, 2003). Asimismo se ha observado la influencia del pH en la regulación de otros genes codificadores de PGs como el gen *pg1* de *F. oxysporum* (Di Pietro et al, 1998). En *B. cinerea*, un medio de pH ácido produce un efecto represor sobre la expresión del gen *bcpG2* e inductor sobre el gen *bcpG3* (Wubben et al., 2000).

También se ha descrito la regulación de PGs, además de otras CWDEs, por medio de MAPK en varias especies (Di Pietro et al., 2009). En *F. oxysporum* mutantes para MAPK mostraban menor expresión de endoPGs (Di Pietro et al, 2001). Una delección en Ste12p de *Colletotrichum lindemuthianum*, un factor de transcripción que actúa en la cascada de MAPK, presentaba actividad pectinasa reducida (Hoi et al., 2007).

En las PGs se ha observado la existencia de modificaciones post transduccionales como la glicosilación, ampliamente descrita en hongos. Se conocen tres funciones biológicas para los oligosacáridos de las glicoproteínas: reconocimiento, influencia en la estructura terciaria y estabilización de las membranas biológicas (Markovic y Janecek, 2001; Rudd et al., 2001). En *F. oxysporum*, la N-glicosilación de Pg1 se mostró esencial para su secreción (Di Pietro & Roncero, 1996). En *F. moniliforme*, se ha comprobado que a partir de un único gen se producen cuatro isoformas distintas de PGs con diferentes niveles de glicosilación (Caprari et al, 1993a). La

glicosilación se mostró esencial para la actividad de una endoPG descrita en *A. niger* (Stratilova *et al.*, 1998).

1.3 Aplicaciones y funciones de PGs

1.3.1 Funciones biológicas

Cuando los patógenos se encuentran la pared celular vegetal, las poligalacturonasas son de las primeras enzimas secretadas (Collmer, 1986) hidrolizando los enlaces entre residuos de ácido D-galaturónico de la homogalacturona, lo que provoca la separación celular y la maceración de los tejidos del hospedador (Di Pietro *et al.*, 2010). La degradación de la pared celular por PGs facilita su hidrólisis completa llevada a cabo por otras CWDEs, al dejar más accesible la red de celulosa y hemicelulosa (Karr & Albersheim, 1970). Por ello, las PGs están involucradas en la penetración de la raíz, la colonización del tejido vascular y la perforación de los vasos del xilema (Beckman, 1987) hasta el punto que en algunos casos se ha asociado el grado de virulencia con el nivel de estas enzimas producidas por los patógenos (Jia *et al.*, 2009). También se ha descrito que las PGs fúngicas inducen la acumulación de fitoalexinas, la síntesis de ligninas y la producción de glucanasas y quitinasas, mecanismos que evitan la colonización por parte del patógeno (De Lorenzo, 1997).

Muchas reacciones de la planta provocadas por PGs fúngicas se deben a la generación de oligogalacturónicos (OGs) que resultan esenciales en el diálogo molecular que se establece durante la patogénesis. Además de ser nutrientes para el hongo, permitiendo su crecimiento y expansión, se ha comprobado que juegan un papel fundamental como inductores de otras enzimas pécticas del hongo y del sistema de defensa de la planta. El mecanismo mediante el cual los OGs activan la respuesta de la planta son desconocidos, pero su ruta de señalización incluye la despolarización de la membrana, la elevación de la concentración de calcio, la activación de proteínas de unión a GTP, la estimulación de fosfolipasas, la inducción de proteínas receptoras de quinasas y la inducción de la fosforilación de proteínas. Los OGs también inducen la formación de especies reactivas de oxígeno, asociada a la muerte celular necesaria para la respuesta hipersensible. El resultado final es la activación transcripcional de genes relacionados con la defensa (D'Ovidio *et al.*, 2004). La aplicación de una preparación de pectinasas o de oligogalacturónicos, pueden disparar efectos fisiológicos profundos en plantas (Di Pietro *et al.*, 2009).

La propia planta también sintetiza PGs involucradas en la hidrólisis de pectina que acompaña a su desarrollo, principalmente cuando se requiere separación celular. Por ejemplo, la actividad PG se ha asociado con la abscisión de órganos, encapsulación y dehiscencia de las anteras, maduración del grano de polen y del fruto, crecimiento del tubo polínico y la expansión celular (Kalaitzis *et al.*, 1997; Hadfield y Bennett, 1998; Payasi y Sanwal, 2003). Por ejemplo, en tomate se han caracterizado seis genes PGs, agrupados en dos clusters y localizados en cromosomas diferentes (Hong y Tucker, 1998). La producción de PGs fúngicos podría llegar a alterar estas funciones en la planta.

Se ha sugerido que las PGs de *F. oxysporum* juegan un papel importante en el desarrollo de la infección al menos en dos fases: penetración de la corteza de la raíz, con el fin de alcanzar el sistema vascular; y colonización y difusión del hongo hacia la parte superior a través de los vasos del xilema (Beckman 1987) siendo de las primeras enzimas producidas cuando entra en contacto con el hospedador (Jones *et al.*, 1972).

1.3.2 Proteínas de plantas inhibidoras de PGs (PGIPs)

Hace varias décadas, Albersheim y colaboradores describieron que la pared celular de la planta contiene proteínas que reducen la actividad de endoPGs del hongo, denominadas proteínas inhibidoras de PGs (PGIPs) (Albersheim y Anderson, 1971). Estas pertenecen a la familia de proteínas ricas en repeticiones de leucina (LRR), se localizan en la pared celular se inducen durante la infección, y presentan gran variabilidad en su reconocimiento e inhibición de las endoPGs. La interacción entre PGIP y endoPG es dependiente de pH y posee gran afinidad resultando en una reducción casi total de la capacidad catalítica, lo que favorece la acumulación de OGs que actúan como elicitores y disparan el mecanismo de defensa de la planta (De Lorenzo & Ferrari, 2002; Di Pietro *et al.*, 2009).

La interacción es tan específica que las PGs de planta no se ven afectadas. Estudios en la FmPG de *F. moliniforme* determinaron la presencia de tres residuos esenciales para la formación del complejo entre PG-PGIP, una Lisina y una Arginina involucradas en la unión al sustrato y una Histidina localizada en la cara opuesta al sitio activo y que en PGs de plantas siempre está sustituida por Prolina. También se ha observado que la presencia de un Triptófano insertado tras una Serina del sitio catalítico en PGs de plantas resulta básico en su interacción con las PGIPs (Federici *et al.*, 2001).

1.3.3 PGs en hongos patógenos

En hongos patógenos han sido clonados y caracterizados distintos genes que codifican PGs. Se ha identificado la presencia de PGs en *A. niger* (Bussink *et al.*, 1991; 1992), en *A. flavus*, existen tres endoPGs, dos reprimibles por glucosa y otra constitutiva (Cleveland y Cotty, 1991). En *Phoma lingam* se ha detectado estirpes virulentas que producen mayor cantidad de PGs que las no virulentas, indicando su relación con la patogénesis (Hassan *et al.*, 1991). En *F. moniliforme*, se han descrito cuatro endoPGs inducidas por pectina, que proceden de modificaciones post-transduccionales de un mismo gen (Caprari *et al.*, 1993a; 1993b). El mutante del gen *enpg-1*, responsable de la principal endoPG extracelular de las tres descritas en el patógeno *Cryphonectria parasitica*, no afectó a su capacidad infectiva (Gao *et al.*, 1996). En *Sclerotinia sclerotiorum*, *pg1* se expresa durante la infección de girasoles y se reprime por glucosa (Reymond-Cotton *et al.*, 1996). Cuando el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* entra en su estado parasítico se detecta la inducción rápida de endoPGs, indicando su papel en la penetración (Centis *et al.*, 1997; Dumas *et al.*, 1999). En *B. cinérea*, las seis endoPGs descritos muestran patrones de regulación diferente, sugiriendo que aquellas con expresión constitutiva liberan productos de degradación de la pectina y provocan la inducción de otras endo- o exoPGs (Wubben *et al.*, 1999).

Existen escasos ejemplos de deleciones dirigidas en genes PG que afecten a la virulencia fúngica. El primer caso fue en el patógeno de maíz *Cochliobolus carbonum* donde se describió una endo- y una exoPG. Ni los mutantes sencillos, ni el doble mutante se vieron afectados en virulencia, pese a que mostraron una drástica reducción en su actividad PG (Scott-Craig *et al.*, 1990; Scott-Craig *et al.*, 1998). En el patógeno de algodón *A. flavus* (Shieh *et al.*, 1997) la deleción de una endoPG (P2c), resultó en una reducción significativa en la agresividad. La deleción de Bcpg1 en *B. cinerea*, que se expresa en ácido poligalacturónico, sacarosa y durante la infección de hojas de tomate, resultó en una disminución significativa del crecimiento del hongo en regiones lejanas al punto de inicio de la lesión (ten Have *et al.*, 1998). En este mismo hongo, la inactivación de Bcpg2 mostró una reducción de las lesiones del 50-85% (Kars *et al.*, 2005). En el patógeno de centeno *Claviceps purpurea* El doble mutante en dos endoPGs resultó en una reducción dramática en virulencia (Oeser *et al.*, 2002)(Tenberge *et al.*, 1996). En *A. citri*, el mutante en una endoPG mostró estar afectado severamente en su habilidad para macerar el tejido de patata y para causar síntomas en cítricos. Por contra, la deleción del gen ortólogo en *A. alternata* no afectó a su virulencia (Isshiki *et al.*, 2001).

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* secreta varias endo- y exoPGs, inducidas en pectina y reprimidas por glucosa (Di Pietro & Roncero, 1996; Garcia-Maceira et al, 2001; Garcia-Maceira et al, 2000). De ellas, Pg1 es la más expresada, mostrando su máxima capacidad como endoPG, pero también capaz de actuar como exoPGs. La hidrólisis de PGA llevada a cabo por esta enzima resultó en la obtención de ácido galacturónico como primer producto de degradación, aunque también aparecieron otros intermediarios. Los productos finales obtenidos fueron ácido mono- y digalacturónico (Di Pietro y Roncero, 1996). Un aislado carente del gen *pg1*, debido a la inserción de un trasposón, no mostró tener afectada su capacidad para infectar plantas de melón (Di Pietro et al., 1998). Por otro lado, la sobreexpresión del alelo Pg1 silvestre en el mismo aislado mostró un incremento de la actividad PG pero ningún efecto en la virulencia, sugiriendo que Pg1 podría no ser un determinante para la virulencia (Di Pietro y Roncero, 1998). Igualmente, las deleciones individuales de otra endo PG, *pg5*, o de una exoPG, *pgx4*, ambas expresadas durante la infección, no afectaron a la habilidad de los mutantes para infectar plantas de tomate (Garcia-Maceira et al., 2000; 2001). La exoPG, Pgc2, ortóloga a *pgx4*, de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* mostró como único producto de degradación ácido galacturónico y la enzima purificada resultó ser capaz de macerar bananas (Dong & Wang, 2011). Una exoPG (*pgx2*) y una endoPGs (*pg1*) descritas en *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, mostraron expresión, a diferentes tiempos, en ácido galacturónico y represión en presencia de glucosa (de las Heras et al, 2003; Patino et al, 1997).

2. Resultados

2.1. Identificación y caracterización *in silico* de PGs

2.1.1 Análisis *in silico* de genes responsables de poligalacturonasas estructurales en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Con la finalidad de identificar las PGs estructurales en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizó una búsqueda *in silico* mediante *BLASTp*, usando la base de datos de *Fusarium* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/), partiendo de las endoPGs (*pg1* y *pg5*) y la exoPG (*pgx4*), descritas previamente (Di Pietro y Roncero, 1996; García-Maceira et al., 2000; 2001). Lo primero que se observó fue las secuencias responsables de los genes FOXG_12535, FOXG_12585, FOXG_17088 y FOXG_14004, resultaron ser completamente

idénticas y en denominaron *pg9*. Además de este gen, tres genes más responsables de endoPGs, denominados FOXG_10052, FOXG_14660 Y FOXG_17000 (*pg8*, *pg11* y *pg12*, respectivamente), y tres nuevos genes exoPGs denominados FOXG_15415, FOXG_09893, FOXG_13191 (*pgx6*, *pgx7* y *pgx10*, respectivamente) fueron identificadas, considerando un valor esperado menor o igual a e^{-150} .

Mediante la comparación con secuencias de aminoácidos de PGs de otras especies fúngicas relacionadas se realizaron modificaciones manuales a las secuencias alojadas en la base de datos de tres genes PGs: FOXG_09893, FOXG_14004 y FOXG_13191 (Tabla 16).

Tabla 16. Modificaciones tras la anotación manual realizada en genes PGs con respecto a la secuencia anotada en la base de datos del genoma de *F. oxysporum*.

Número de acceso ¹	Gen	Proteína original (aa)	Proteína modificada (aa)	Modificación realizada
FOXG_09893	<i>pgx7</i>	332	406	La fase abierta de lectura se extiende 225 nucleótidos aguas arriba del ATG
FOXG_14004	<i>pg9</i>	324	379	La fase abierta de lectura se extiende 168 nucleótidos aguas arriba del ATG
FOXG_13191	<i>pgx10</i>	439	477	Reducción del final del extremo 5' del primer intrón en 18 nucleótidos; Una región de 39 nucleótidos del segundo intrón pasa a ser región codificante generándose un nuevo intrón; Reducción de 21 nucleótidos del 5' del tercer intrón; Una región de 75 nucleótidos del cuarto intrón pasa a ser región codificante y se genera un nuevo intrón, 36 nucleótidos mayor

¹Número de acceso según la anotación de la web (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/)

En la tabla 17 se resumen las características de interés de las PGs de *F. oxysporum*, incluyendo su peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) teóricos según los datos deducidos de la web (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html).

Tabla 17. Características de los genes responsables de enzimas PGs

Número de acceso ¹	Gen	Descripción del gen			Descripción de la proteína deducida			
		Cromosoma	Longitud gen con intrones	Longitud ORF	Nº aa	Tamaño ²	pI ²	Péptido señal ³
FOXG_08862	<i>pgx4</i>	2a	1622	1368	455	50,03	5,8	1-21
FOXG_09893*	<i>pgx7</i>	11	1221	1221	406	43,63	5,86	1-21
FOXG_10052	<i>pg8</i>	11	1185	1137	378	39,34	9,2	1-18
FOXG_12535 [#]	<i>pg9</i>	3	1198	1140	379	39,97	8,02	
FOXG_12585 [#]		3						
FOXG_17088 [#]		6						
FOXG_14004 ^{#*}		6						
FOXG_13051	<i>pg5</i>	9	1131	1083	360	37,18	8,63	1-17
FOXG_13191*	<i>pgx10</i>	12	1728	1434	477	53,15	5,54	1-20
FOXG_14660	<i>pg11</i>	12	1455	1455	484	53,86	5,29	1-23
FOXG_14695	<i>pg1</i>	12	1318	1116	371	38,45	6,36	1-16
FOXG_15415	<i>pgx6</i>	5	1589	1395	464	51,67	8,55	1-18
FOXG_17000	<i>pg12</i>	No localizado	1434	1434	477	52,72	5,15	

¹Número de acceso según la web (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/); ²Peso molecular en KiloDaltons (kDa) y punto isoeléctrico (pI) teóricos obtenidos de la web (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html); ³Sitio de corte del péptido señal obtenido mediante *SignalP v4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); *Genes modificados manualmente; [#]Genes idénticos entre sí.

Para un análisis más detallado se alinearon las secuencias de aminoácidos deducidas de las 10 PGs identificadas, el cual reveló un grado de identidad comprendido entre 10 y 60 %. Todas contienen los dominios conservados propuestos para poligalacturonasas, Asn-X-Asp (NXD), Asp-Asp (DD), Gly-His-Gli-X-Ser-Ile-Gly-Ser (GHGXSIGS) y Arg-Ile-Lys (RIK) y Tyr (Y) (Caprari *et al.*, 1993a; Kitamoto *et al.*, 1993; Reymond *et al.*, 1994; Stratilova *et al.*, 1998), salvo pequeñas excepciones en los genes *pgx7*, *pg11* y *pg12* (Figura 36). Las cuatro exoPGs no presentan la glicina del motivo GHGXSIGS, que está sustituida por una serina o una treonina, además presentan dos cisteínas próximas a la tirosina del sitio catalítico, descritas en otras exoPGs (Markovic y Janecek, 2001).

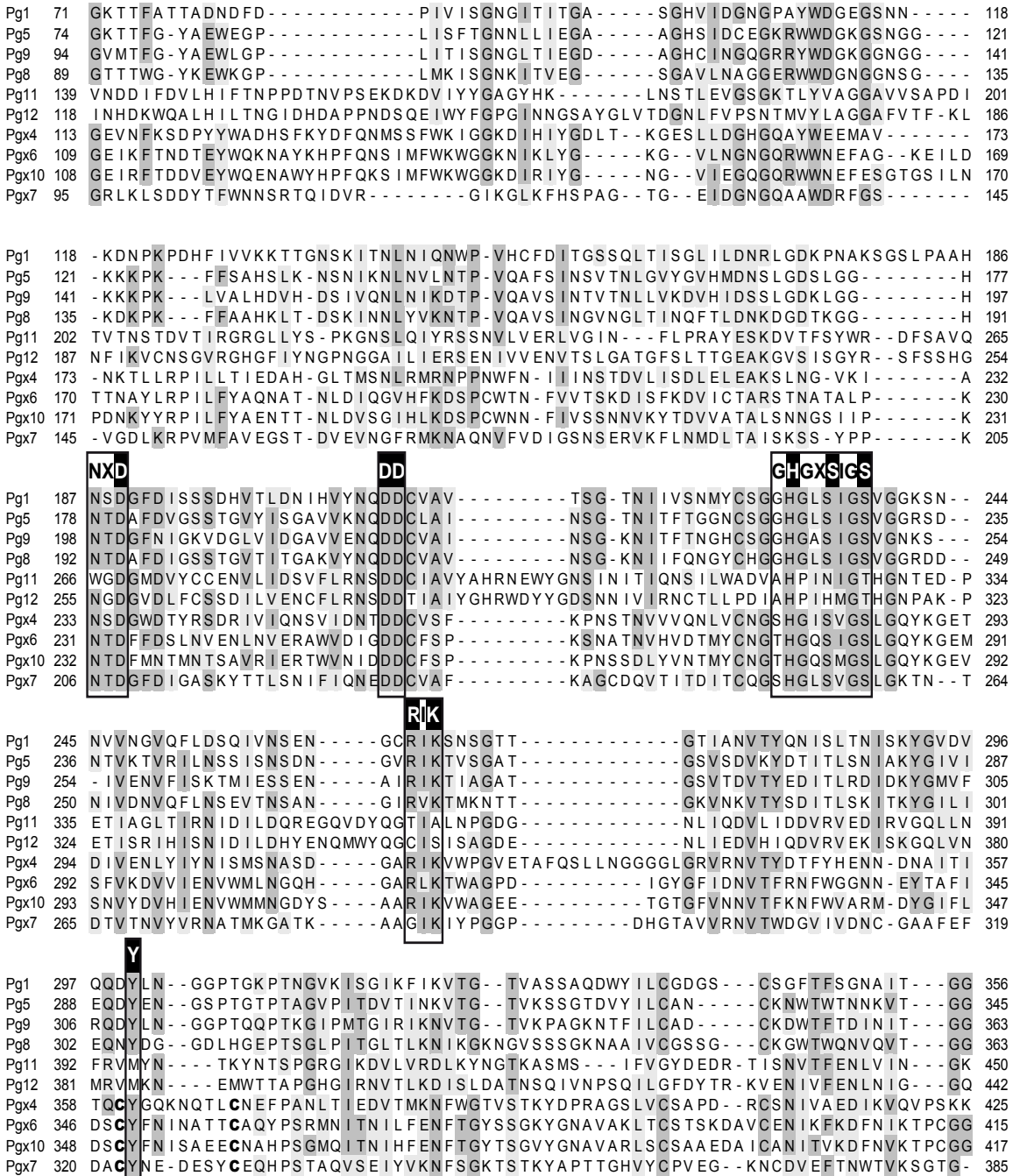


Figura 36. Alineamiento de PGs estructurales, identificadas en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mediante el método *ClustalW* con el programa *Bioedit v7.0.0*. Los dominios conservados aparecen encuadrados y los residuos esenciales para la funcionalidad aparecen sombreados en negro. Los residuos de cisteína de exoPGs se indican en letra negra. Solo se muestra la región central de las proteínas deducidas.

2.1.2 Relaciones filogenéticas entre PGs de *F. oxysporum* con ortólogos de especies fúngicas

En una primera aproximación se determinó la identidad entre las PGs de *F. oxysporum* y las ortólogas de *F. graminearum* y *F. verticillioides* según la web (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/). Se observó, que para cinco de las diez PGs identificadas en *F. oxysporum*, no existían ortólogos en *F. graminearum*, cuatro no lo tenían en *F. verticillioides*, y tres de ellas en ninguno de estas especies. Entre todas las ortólogas se observó una identidad superior al 75 % (Tabla 18).

Tabla 18. Identidad entre las secuencias de amino ácidos deducidos de PGs de *F. oxysporum* con los ortólogas en *F. graminearum* y *F. verticillioides* según las bases de datos, incluyendo la más próxima en cada caso

<i>F. oxysporum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
Número de acceso	Proteína	Número de acceso	Identidad (%)	Número de acceso	Identidad (%)
FOXG_08862	Pgx4	FGSG_10708	75	FVEG_05801	87
FOXG_09893	Pgx7	-	-	-	-
FOXG_10052	Pg8	FGSG_03194	80	FVEG_08451	88
FOXG_12535#					
FOXG_12585#	Pg9	-	-	-	-
FOXG_17088#					
FOXG_14004#					
FOXG_13051	Pg5	FGSG_11011	84	FVEG_11787	91
FOXG_13191	Pgx10	FGSG_03384	81	-	-
FOXG_14660	Pg11	-	-	FVEG_13484	81
FOXG_14695	Pg1	-	-	FVEG_13516	82
FOXG_15415	Pgx6	FGSG_07551	85	FVEG_12744	93
FOXG_17000	Pg12	-	-	-	-

#Genes idénticos

Las secuencias de amino ácidos deducidos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y otras de especies fúngicas relacionadas, obtenidas mediante *BLASTp* de la web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que mostraron valor esperado igual o menor de e^{-150} , se alinearon para construir un árbol filogenético (Figura 37). Las proteínas aparecen agrupadas en dos clados, uno que contiene a las exoPGs y otro a las endoPGs.

2.1.3 Análisis de regiones promotoras

Se estudió la región promotora de los genes PGs de *F. oxysporum* para identificar secuencias de posible regulación para factores de transcripción (Tabla 19). Estudios previos del promotor de *pg1*, mediante deleciones secuenciales de fragmentos, realizados en nuestro grupo habían determinado que la región “T T G G G C A A” localizada en la posición – 430 aguas arriba del codón de inicio, resultaba esencial para la inducción por ácido poligalacturónico (Sancho-Zapatero y colaboradores, 2000, sin publicar). Los promotores de otras PGs fúngicas (*Cochliobulus carbonum*, *Aspergillus parasiticus*, *Kluyveromyces marxianus* y *Sclerotinia sclerotiorum*), y de *pgx4*, mostraban secuencias similares, determinándose como consenso “T T G/T N G C/A A A”, denominada “caja de inducción por pectina”. En el presente estudio se ha identificado dicha región en los promotores *pgx6* y *pg12* y dos copias del elemento en *pg1*. Por otro lado, la mayoría de los promotores contienen motivos CREA (G/C Y G G G G) relacionados con el metabolismo de fuentes de carbono (Kulmburg *et al.*, 1993). Seis de ellos contienen motivos relacionados con el control del desarrollo, como son Ste12p (T G A A A C A) (Madhani y Fink, 1998b) y AbaA (C A T T C Y) (Andrianopoulos y Timberlake, 1994), que es idéntico a la secuencia de unión de factores de transcripción de la familia TEA/ATTS en *S. cerevisiae* (Madhani y Fink, 1998b).

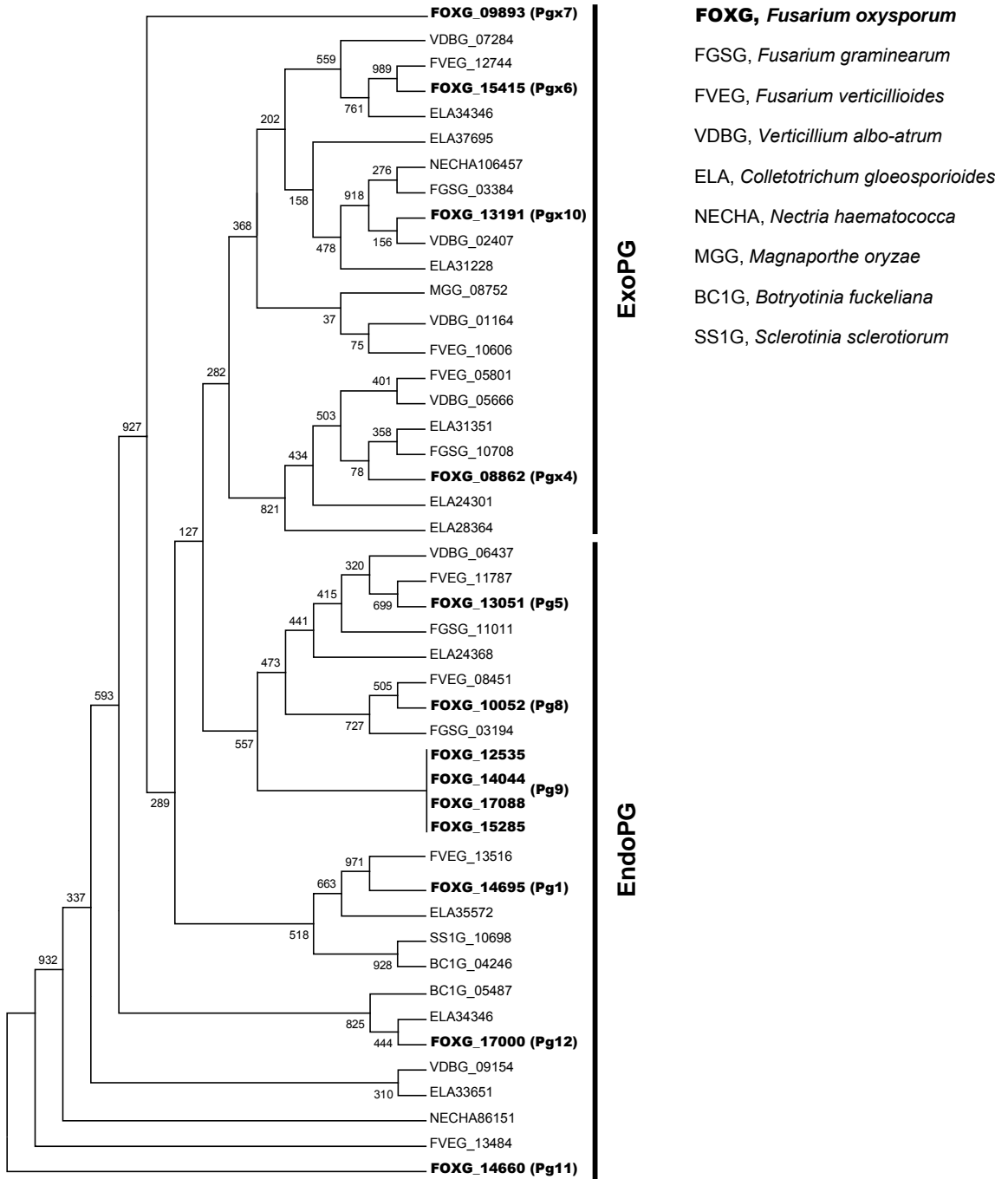


Figura 37. Análisis filogenético de genes responsables de PGs realizado mediante el programa *PHYML* v3.0 usando el método de máxima parsimonia optimizado por el programa *MODELGENERATOR* v0.85. El resultado del análisis se muestra como un árbol filogenético representado con el programa *MEGA* v4.

Tabla 19. Motivos de posible regulación por factores de transcripción (conocidos o presuntos) encontradas en la región promotora de los genes PGs de *F. oxysporum*

Gen	Motivos de regulación (localización con respecto al codón de inicio)			
	Caja pectina	CREA	AbaA	Ste12p
<i>pg1</i>	- 731; - 431	- 876	No identificado	No identificado
<i>pgx4</i>	- 454	- 527; - 200	- 353	No identificado
<i>pg5</i>	No identificado	- 623	- 825; -74; - 27; - 11	- 423
<i>pgx6</i>	- 894	- 209; - 134	No identificado	No identificado
<i>pgx7</i>	No identificado	- 668; - 295	- 902	- 589
<i>pg8</i>	No identificado	- 403	- 168	- 454
<i>pg9</i>	No identificado	- 894	No identificado	- 527
<i>pgx10</i>	No identificado	No identificado	No identificado	No identificado
<i>pg11</i>	No identificado	No identificado	No identificado	No identificado
<i>pg12</i>	- 770; - 460	No identificado	- 678; - 333	No identificado

2.2. Patrón de expresión de los genes PGs

2.2.1 Perfil de inducción *in vitro*

La expresión de los genes PGs se analizó mediante qRT-PCR con cebadores específicos (Tabla 4) sobre ADNc obtenido del ARN extraído a diferentes tiempos de cultivos en SM con 0.5% (m/v) de glicerol, glucosa, pectina o pectina más glucosa, a 28 °C (Tabla 20). El gen de la actina se usó como control endógeno. Se identificaron transcritos de todos los genes ensayados, pero tan solo *pg1*, *pgx4*, *pg5* y *pgx6* mostraron valores superiores al 0.1 % en relación a la actina. La expresión en glicerol y en glucosa, aunque detectable, fue siempre menor al 2% indicando su expresión basal. La expresión aumentaba en pectina (10–60 %), especialmente en el gen *pg1*, que mostró una expresión hasta 750 veces superior a la actina, y se reprimía siempre en glucosa. Las PGs presentaron expresión máxima a las 48 horas y después disminuyó, excepto *pgx4* que presentó la máxima expresión a las 10 horas de crecimiento del hongo.

Tabla 20. Expresión de genes PGs en distintas fuentes de carbono: 0.5 % de glicerol (Gly), glucosa (Glu), pectina (Pec) o pectina más glucosa (Pec + Glu) en relación a actina (%).

Gen	<u>10 h</u>				<u>48 h</u>				<u>72 h</u>			
	Gly	Glu	Pec	Pec + Glu	Gly	Glu	Pec	Pec + Glu	Gly	Glu	Pec	Pec + Glu
<i>pg1</i>	0,8	0,2	57,2	0,5	0,7	1,4	744	> 0,1	0,6	0,4	156	> 0,1
<i>pgx4</i>	0,1	> 0,1	57,2	0,2	0,1	0,6	15,4	0,3	0,1	0,1	10,5	0,5
<i>pg5</i>	1,3	0,5	25	> 0,1	0,3	0,6	54,1	> 0,1	0,3	0,2	7,1	0,1
<i>pgx6</i>	> 0,1	> 0,1	0,8	1,6	> 0,1	0,1	12,7	0,5	> 0,1	> 0,1	10,7	0,2

2.2.2 *in vivo* durante infección de tomate

La expresión *in planta* se determinó mediante qRT-PCR con cebadores específicos (Tabla 4) sobre ADNc obtenido a partir del ARN extraído de raíces y tallos de plantas de tomate a diferentes tiempos post-infección con la estirpe silvestre. No se observó expresión en plantas no inoculadas (control). El gen de la actina fue el control endógeno, observándose expresión en raíces y tallos. Se analizó la expresión de los diez genes PGs. Entre ellos *pg1*, *pgx4*, *pg5* y *pgx6*, mostraron mayor nivel de transcripción que el resto (10-60 % con respecto a actina) siendo máxima a diferentes tiempos pero siempre en raíz, excepto *pg4x* que alcanzó la máxima expresión en raíz a los 4 días y posteriormente mostró una expresión constante y un pico de expresión en tallos a los 4 días post-infección (Figura 38). Destaca por encima del resto la expresión de *pg1*, tanto en raíces como en tallo. El resto de las PGs mostraron niveles de expresión inferiores al 0,5 % con respecto a actina (datos no mostrados).

2.3. Obtención de estirpes mutantes

Teniendo en cuenta la expresión de genes detectados *in vitro* e *in planta*, se consideró que *pg1* y *pgx6* eran buenos candidatos para ser inactivados mediante interrupción dirigida, considerando que *pgx4* y *pg5* ya habían sido deletados en nuestro grupo (García-Maceira *et al.*, 2000; 2001).

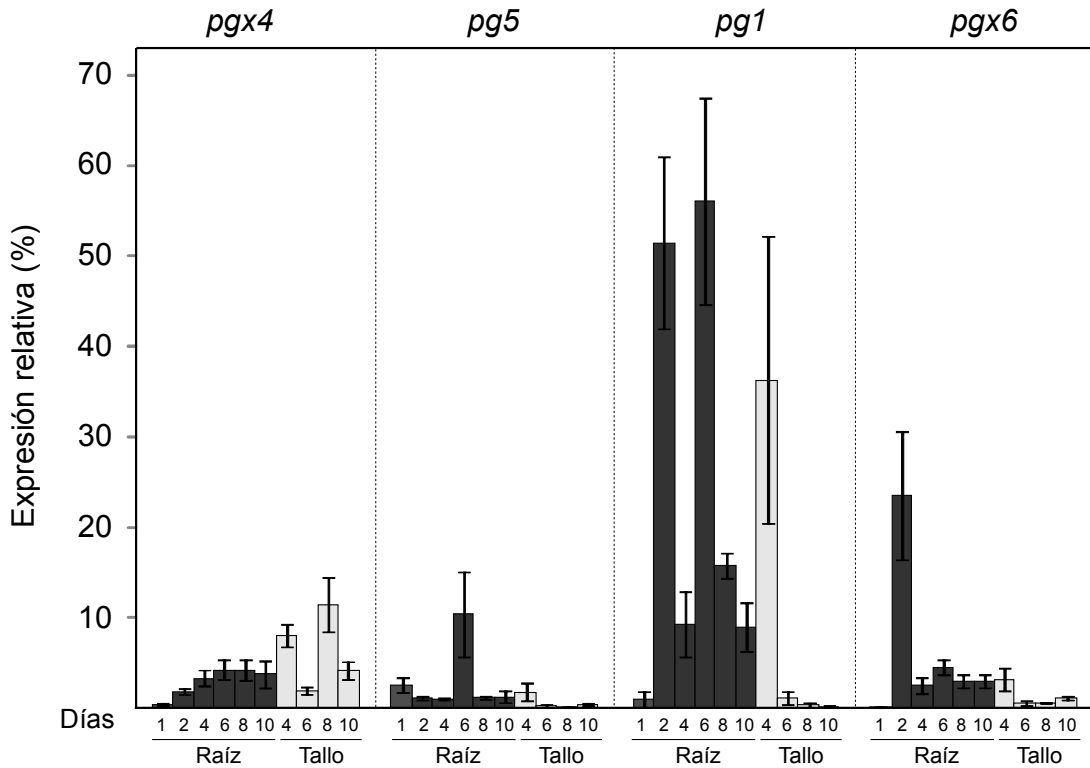


Figura 38. Expresión de genes PGs mediante análisis por qRT-PCR durante la infección de *F. oxysporum* en plantas de tomate. Las muestras de ARN fueron extraídas de raíces (barras oscuras) o tallos (barras claras) obtenidas entre 1 y 10 días tras la infección. Las barras representan el error estándar calculado a partir de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

Para obtener estirpes mutantes se usó la técnica *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003) (Ver materiales y métodos 5.2.3.) que permite sustituir el alelo silvestre por un marcador seleccionable. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que amplifican mediante PCR del ADNg fragmentos de aproximadamente 1 kb flanqueantes a la ORF del gen diana, tanto del extremo -5' como del -3'. Ambos fragmentos, por separado, se fusionaron al 75 % del casete de resistencia a higromicina B (Hyg^R), en el caso de *pg1*, o el casete de resistencia a fleomicina (Phl^R), en el caso de *pgx6*, mediante PCR de fusión (Carroll *et al.*, 1994). En cada caso, las dos construcciones solapantes obtenidas se utilizaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre, con el objetivo de reemplazar el gen diana por el correspondiente casete de resistencia.

Los transformantes obtenidos se analizaron mediante PCR con cebadores externos a la construcción, esperando observar bandas de mayor tamaño en los recombinantes homólogos que en el silvestre, y PCR con oligos de la ORF. Hasta la fecha, tras la realización de cuatro transformaciones independientes y la comprobación de 104 transformantes de *pg1* y 62 de *pgx6* capaces de crecer en medio selectivo, no se han obtenido mutantes con re-emplazamiento génico de los genes bajo análisis.

3. Discusión

La lamela media, formada principalmente por pectina, es la principal capa de la pared celular en plantas superiores (Di Pietro *et al.*, 2009) (Figura 33). La pared celular aporta un soporte estructural y constituye una línea de defensa frente a patógenos. Por este motivo, las enzimas capaces de degradar la pectina se consideran determinantes de patogenicidad. Las PGs son las pectinasas más estudiadas debido a su inducción masiva por sustratos pécticos y su habilidad para macerar los tejidos de la planta (Collmer y Keen, 1986). En *F. oxysporum* se han caracterizado previamente dos endoPGs (*pg1* y *pg5*) y una exoPG (*pgx4*) (Di Pietro y Roncero, 1996a; Di Pietro y Roncero, 1998; García-Maceira *et al.*, 2000; 2001). Para conocer el papel del conjunto de PGs presentes en *F. oxysporum*, en este estudio se ha investigado el genoma del hongo y se ha estudiado el perfil de expresión *in vitro* e *in planta*, durante el proceso de infección, para determinar su función en la virulencia.

3.1. *F. oxysporum* presenta una familia génica de PGs

El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum*, ha permitido identificar siete nuevas PGs (cuatro endoPGs y tres exoPGs), además de las descritas previamente *pg1* (Di Pietro y Roncero, 1996a), *pgx4* y *pg5* (García-Maceira *et al.*, 2000; 2001). En este hongo también se había identificado otra (*pg2*), inicialmente considerada como poligalacturonasa (Di Pietro y Roncero 1996b), que posteriormente resultó no serlo. Al igual que *F. oxysporum*, numerosas especies fúngicas poseen varios genes PGs, que exhiben gran polimorfismo, difiriendo en su propiedades enzimáticas, peso molecular, regulación, etc. Este hecho se puede explicar por la complejidad de la pectina y/o a las posibles modificaciones producidas en las PGs para escapar a la acción de las PGIPs, habiéndose demostrado que un único residuo puede ser clave en su reconocimiento (Federici *et al.*, 2001), y por tanto, diferencias puntuales podrían resultar en no

ser afectadas. Así, el poseer varios miembros de una familia de PGs puede suponer una ventaja para el patógeno, ofreciendo gran flexibilidad durante la invasión en diferentes condiciones y hospedadores (D'ovidio et al 2003).

Las PGs de *F. oxysporum* muestran todos los sitios conservados descritos en PGs: NXD, DD, GHGXSIGS, RIK y una tirosina en el sitio catalítico (Caprari et al., 1993a; Kitamoto et al., 1993; Reymond et al., 1994; Stratilova et al., 1998); además de secuencias de aminoácidos variables indicativo de variaciones en su regulación y/o en la especificidad de sustrato (Figura 36). Tres de los genes PGs identificados (*pgx7*, *pg11* y *pg12*) presentan diferencias en residuos esenciales de regiones conservadas. Esto podría considerarse un mecanismo de diversidad, pero el escaso nivel de expresión mostrado por estos genes (Tabla 20; Figura 38), tanto en medio de inducción como *in vivo*, indican más bien que dichas PGs pueden ser no funcionales.

Nuestra búsqueda *in silico* reveló mayor número de PGs en el genoma de *F. oxysporum* que en *F. graminearum* y *F. verticillioides* (Tabla 18), hecho también descrito para otras familias génicas del género (Ma et al., 2010), como las lipasas estudiadas en el capítulo 1 de este trabajo. El análisis filogenético de las secuencias deducidas de amino ácidos de las 10 PGs de *F. oxysporum* con las ortólogas de otras especies fúngicas mostraron dos clados diferenciados separando las exoPGs de las endoPGs (Figura 37). Estudios anteriores ya mostraron resultados similares (Wubben et al 1999; Markovic y Janecek 2001) determinándose que las exoPGs fúngicas forman un grupo homogéneo y claramente aislado de las endoPGs, hasta el punto de que algunos autores proponen que las exoPGs están filogenéticamente más próximos a las PGs de plantas que a las endoPGs de hongos (Kester, et al., 1996).

Debido a la relativamente escasa información disponible sobre exoPGs, las diferencias estructurales entre exo- y endoPGs no están definidas. Se destaca que en endoPGs el hueco del sitio activo está abierto en ambos lados en y en las exoPGs cerrado en uno de ellos (Abbott y Boraston, 2007; Pijning et al 2009). En los alineamientos realizados, la glicina adyacente a la histidina del sitio activo (Caprari et al., 1996), no está presente en las exoPGs analizadas, siendo sustituida por serina o por treonina (Figura 36), como ya se habría descrito en *pgx4* (Garcia-Maceira et al., 2000) y en las exoPGs de *C. carbonum* (Scott-Craig et al. 1998) y *A. tubingensis* (Kester et al. 1996). Además, las cuatro exoPGs poseen dos residuos cisteína próximos a la tirosina del sitio catalítico ausente en las endoPGs. La presencia de estas cisteínas en exoPGs, descritas previamente, podrían estar implicadas en la formación de puentes disulfuro (Markovic y Janecek, 2001).

3.2. La mayoría de las PGs estudiadas se inducen en pectina, se inhiben en glucosa y se expresan durante infección de plantas

El perfil de expresión de los genes PGs en *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante qRT-PCR mostró la inducción de dos endoPGs (*pg1* y *pg5*) y dos exoPGs (*pgx4* y *pgx6*) en con pectina y durante el proceso de infección (Tabla 20 y Figura 38), indicando la participación de dichas PGs en patogénesis. Las diferentes PGs exhibieron un patrón de expresión diferencial, siendo en la mayoría una expresión basal muy baja y únicamente *pg1*, *pgx4*, *pg5* y *pgx6* inducidas significativamente (superior a 10 % respecto a la actina), tanto en pectina como durante la infección. Entre estas, el gen *pg1* el más expresado tanto en medio de inducción (más de 700 veces) como durante la infección (el doble), por lo que se considera como responsable principal de la degradación de pectina. La otra endoPG (*pg5*) tiene un patrón de expresión similar a *pg1* aunque significativamente inferior, por lo que su función podría ser secundaria o estar actuando sobre sustratos diferentes. Generalmente las endoPGs exhiben diferentes modos de acción realizando ataques simples generando oligómeros grandes gradualmente convertidos en fragmentos pequeños, o realizando ataques múltiples y produciendo oligómeros pequeños desde el inicio (Parenicova et al 2000). La expresión máxima de estos genes se detectó en pectina a las 48 horas, indicando la inducción de estos genes por productos de su degradación, como se ha descrito en otras pectinasas (Riou, 1991). Pasadas las 48 horas se reduce la expresión, debido a la desaparición del sustrato. Durante la infección de plantas de tomate, ambas endoPGs mostraron su máxima expresión tras 6 días post-inoculación. Por su parte, las dos exoPGs mostraban patrones muy contrarios. En medio de inducción con pectina, *pgx6* mostró expresión a partir de las 48 horas y sin embargo *pgx4* mostró máxima expresión a las 10 horas. *In planta*, el patrón fue el contrario, *pgx6* presentó máxima expresión a los 2 días, tras lo cual mantenía la expresión constante a menor nivel, y *pgx4* alcanzó su máxima expresión a los 4 días a partir del cual permaneció constante. Además, *pgx4* es el único gen que aumentó su expresión en tallos, pudiendo indicar su participación en el avance del hongo hasta la parte superior de la planta. Los cuatro genes se inhibían en presencia de glucosa, hecho ampliamente descrito en otras PGs (Annis y Goodwin, 1997) que concuerda con la presencia de sitios de reconocimiento para el factor CREA, un regulador asociado a la inhibición en presencia de fuentes de carbono (Kulmburg et al., 1993), en las cuatro genes mencionados. Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con los trabajos realizados previamente sobre *pg1* (Di pietro y Roncero 1998), *pgx4* y *pg5* (Garcia-Maceira 2000; 2001). Aunque las exoPGs se expresan a niveles inferiores a los de *pg1*, posiblemente debido a su papel más relevante

durante los estadios tardíos del procesamiento de la pectina degradando los OGs producidos que actuarían como moléculas elicitoras e inductoras (Favaron *et al.*, 1988). Además, las exoPGs no son inhibidas por PGIPs (Cervone *et al.*, 1990, 1989), además de favorecer la presencia de OGs (D'ovidio *et al.* 2003), motivo por el cual estas enzimas podrían evitar la respuesta de defensa de la planta resultando claves durante el proceso de infección. De este modo, el patrón de expresión a diferentes tiempos de ambas exoPGs podría explicarse por la degradación secuencial más tardía de los OGs producidos por las endoPGs a lo largo del proceso de infección.

La regulación diferencial de las PGs ha sido documentada en *B. cinerea*, donde se han observado diferencias de expresión génica entre cultivos *in vitro* (Wubben, *et al.*, 1999) y los obtenidos *in planta* (Ten Have, *et al.*, 2001). La determinación de la regulación de estos genes sería esencial para entender el significado biológico de la aparente redundancia génica. Varios mecanismos de regulación podrían contribuir a la expresión de estos genes en plantas infectadas (Wubben, *et al.*, 2000): expresión basal, inducción por monómeros de pectina, represión mediante glucosa, y modulación de la expresión mediante el pH del medio, lo cual ha sido previamente descrito en *F. oxysporum* (Di Pietro y Roncero 1998; Caracuel *et al.* 2003). Además, la presencia de motivos relacionados con el control del desarrollo del hongo (Aba/Tec1p o Ste12p) en el promotor de varias PGs podría indicar que puedan estar reguladas en función del estado del hongo, además de por sustratos.

3.3. Obtención de mutantes de *pg1* y *pgx6*

El patrón de expresión de los genes PGs identificados en *F. oxysporum* muestra que cuatro de ellos son de máximo interés para determinar su función durante la patogénesis. Previamente se habían obtenido mutantes de los genes *pgx4* y *pg5* sin observarse diferencias en el desarrollo de la infección (García-Maceira 2000; 2001). Con la finalidad de determinar la implicación en la virulencia del hongo, este estudio abordó la delección de los genes *pg1* y *pgx6*. Aunque de este último gen existía un aislado natural debido a la interrupción mediada por un trasposón, y no a una delección completa del mismo (Di Pietro y Roncero 1998).

Tras varios intentos y casi un centenar de transformantes obtenidos para cada gen, no se ha encontrado ningún mutante recombinación homóloga en ninguno de estos genes. La posibilidad de que sean letales es poco consistente al tratarse de enzimas extracelulares

relacionadas con la infección y/o la obtención de nutrientes, y los medios usados para la transformación poseen abundante fuente de carbono. Por otro lado, la técnica de *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003) ha mostrado su éxito en multitud de interrupciones génicas realizadas en nuestro grupo, incluyendo la obtención de mutantes lipasas realizadas en el capítulo 1 de este trabajo, mostrando cerca del 20 % de recombinaciones homólogas en los transformantes obtenidos. Una explicación para la dificultad encontrada podría ser la inaccesibilidad por excesiva condensación de la región del ADN que contiene a estos genes. La región genómica donde se inicia la transcripción, la cromatina se encuentra menos condensada que en zonas inactivas que no se están transcribiendo. Es más probable la recombinación homóloga en regiones con la cromatina más abierta que en otras con alto grado de condensación. Por este motivo, la obtención de protoplastos en medio de inducción para PGs podría solventar el problema, como ya ocurrió con la delección realizada en *pgx4* (García-Maceira, 2000).

No obstante, ya que esta especie posee varias PGs probablemente sea necesaria la eliminación de varios de estos genes para determinar el papel de las PGs en patogenicidad. Por este motivo el objetivo final no debe de ser la obtención de mutantes simples, sino que mutantes dobles podría determinar mejor el papel jugado por las PGs.

CONCLUSIONES

1. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* contiene en su genoma un complejo sistema lipolítico extracelular, incluyendo genes estructurales y reguladores, que le confieren flexibilidad para hidrolizar compuestos lipídicos.

2. La actividad lipasa está determinada principalmente por enzimas extracelulares de pequeño tamaño y bajo punto isoeléctrico.

3. Los factores transcripcionales Ctf1 y Ctf2 son responsables de regular la mayoría de las lipasas analizadas.

4. El sistema lipolítico de *F. oxysporum* interviene en el metabolismo de ácidos grasos observándose una relación directa con la virulencia en plantas de tomate.

5. El gen *lip1* interviene en la producción del pigmento bikaverina acumulado en aceite de germen de trigo.

6. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* contiene en su genoma una familia de genes endo y exo-poligalacturonasas que le podría aportar flexibilidad para hidrolizar pectina, aunque esta capacidad parece determinada por cuatro de ellas (*pg1*, *pgx4*, *pg5* y *pgx6*).

7. Las poligalacturonasas de *F. oxysporum* se inducen en presencia de pectina y se inhiben por glucosa, sugiriendo su función en el metabolismo de nutrientes.

8. Las poligalacturonasas intervienen a diferentes tiempos durante el proceso de infección de plantas de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott DW, Boraston AB (2007) The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. *J Mol Biol* **368**: 1215-1222
- Abbott DW, Boraston AB (2008) Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 301-316, table of contents
- Agrios GN (1997) Plant Pathology. San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological Control of Plant Diseases: The European Situation. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 329-341
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Annis S, Goodwin P (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 1-14
- Armstrong GM, Armstrong JK (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*, PE Nelson, Tousson, TA, and Cook, RJ, ed (University Park, PA, USA: State University Press), pp: 391-399
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroeck EJ, Waalwijk C (2000) Gene Genealogies and AFLP Analyses in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Nonmonophyletic Formae Speciales Causing Wilt and Rot Disease. *Phytopathology* **90**: 891-900
- Beckman CH (1987) The nature of wilt diseases of plants. *Minnesota, EEUU, APS Press*
- Bednarek P, Osbourn A (2009) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**: 746-748
- Benhamou N (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **1**: 233-240
- Bonivento D, Pontiggia D, Matteo AD, Fernandez-Recio J, Salvi G, Tsernoglou D, Cervone F, Lorenzo GD, Federici L (2008) Crystal structure of the endopolygalacturonase from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lupini* and its interaction with polygalacturonase-inhibiting proteins. *Proteins* **70**: 294-299

- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. *The Eastern Press limited London and Reading*
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brady ST, Pfister KK, Bloom GS (1990) A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1061-1065
- Brockerhoff H, Jensen R (1974) Lipolytic Enzymes. *Academic Press, New York*
- Brodhagen M, Tsitsigiannis DI, Hornung E, Goebel C, Feussner I, Keller NP (2008) Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*-seed pathosystem. *Mol Microbiol* **67**: 378-391
- Callow JA (1987) Models for host-pathogen interactions. *The applied mycology of Fusarium Cambridge University Press*: 36-69
- Cambillau C, van Tilbeurgh H (1993) Structure of hydrolases: lipases and cellulases. *Current Opinion in Structural Biology* **3**: 885-895
- Canero DC, Roncero MI (2008) Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **98**: 509-518
- Caprari C, Bergmann C, Migheli Q, Salvi G, Albersheim P, Darvill A, Cervone F, De Lorenzo G (1993a) *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**: 453-462
- Caprari C, Mattei B, Basile ML, Salvi G, Crescenzi V, De Lorenzo G, Cervone F (1996) Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 617-624
- Caprari C, Richter A, Bergmann C, Lo Cicero S, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G (1993b) Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycological Research* **97**: 497-505

- Caracuel Z, Roncero MI, Espeso EA, Gonzalez-Verdejo CI, Garcia-Maceira FI, Di Pietro A (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* **48**: 765-779
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**: 1-30
- Carroll AM, Sweigard JA, Valent B (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Newsletter* **41**: 22
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552
- Catlett NL, Lee BN, Poder OC, Turgeon G (2003) Split-Marker Recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter* **50**: 9-11
- Centis S, Guillas I, Sejalon N, Esuerre-Tugaye MT (1997) Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 769-775
- Commenil P, Belingheri L, Bauw G, Dehorter B (1999) Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 37-43
- Commenil P, Belingheri L, Dehorter B (1998) Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and molecular plant pathology* **52**: 1-14
- Cousin X, Hotelier T, Giles K, Toutant JP, Chatonnet A (1998) aCHEdb: the database system for ESTHER, the alpha/beta fold family of proteins and the Cholinesterase gene server. *Nucleic Acids Res* **26**: 226-228
- Cuomo CA, Guldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma LJ, Baker SE, Rep M, Adam G, Antoniw J, Baldwin T, Calvo S, Chang YL, Decaprio D, Gale LR, Gnerre S, Goswami RS, Hammond-Kosack K, Harris LJ, Hilburn K, Kennell JC, Kroken S, Magnuson JK, Mannhaupt G, Mauceli E, Mewes HW, Mitterbauer R, Muehlbauer G, Munsterkotter M, Nelson D, O'Donnell K, Ouellet T, Qi W, Quesneville H, Roncero MI, Seong KY, Tetko IV,

- Urban M, Waalwijk C, Ward TJ, Yao J, Birren BW, Kistler HC (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* **317**: 1400-1402
- Cygler M, Grochulski P, Kazlauskas RJ, Schrag JD, Bouthillier F, Rubin B, Serreqi AN, Gupta AK (1994) A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *Journal of the American Chemical Society* **116**: 3180-3186
- Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park SY, Kang S (2007) In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the Arabidopsis root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1011-1023
- Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubes JP, Comeau LC, Sarda L (2002) Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* **37**: 653-662
- Cho SW, Lee S, Shin W (2001) The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *J Mol Biol* **311**: 863-878
- Christensen SA, Kolomiets MV (2011) The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet Biol* **48**: 4-14
- D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1696**: 237-244
- Daboussi MJ, Capy P (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* **57**: 275-299
- de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**: 839-842
- de las Heras A, Patino B, Posada ML, Martinez MJ, Vazquez C, Gonzalez Jaen MT (2003) Characterization and in vitro expression patterns of an exopolygalacturonase encoding gene from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *J Appl Microbiol* **94**: 856-864

- De Lorenzo G, Ferrari S (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 295-299
- de Vries RP, Jansen J, Aguilar G, Parenicova L, Joosten V, Wulfert F, Benen JA, Visser J (2002) Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **530**: 41-47
- Derewenda ZS, Sharp AM (1993) News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci* **18**: 20-25
- Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev* **57**: 595-604
- Devescovi G, Bigirimana J, Degrassi G, Cabrio L, LiPuma JJ, Kim J, Hwang I, Venturi V (2007) Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4950-4958
- Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Caracuel Z, Barbieri AS, Roncero MIG (1998) Endopolygalacturonase PG1 in Different Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1967-1971
- Di Pietro A, Garcia-MacEira FI, Meglecz E, Roncero MI (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**: 1140-1152
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* **4**: 315-325
- Di Pietro A, Roncero M, Roldán M (2009) From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection. In *Plant Relationships*, Deising H (ed), Vol. 5, 10, pp 181-200. Springer Berlin Heidelberg
- Di Pietro A, Roncero MI (1996) Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 295-299
- Dickson RC, Lester RL (2002) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1583**: 13-25

- Dixon RA, Lamb CJ (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology* **41**: 339-367
- Dong Z, Wang Z (2011) Isolation and characterization of an exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and race 4. *BMC Biochem* **12**: 51
- Dumas B, Centis S, Sarrazin N, Esquerre-Tugaye MT (1999) Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1769-1771
- Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D (2001) Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13425-13430
- Feng J, Liu G, Selvaraj G, Hughes GR, Wei Y (2005) A secreted lipase encoded by LIP1 is necessary for efficient use of saturated triglyceride lipids in *Fusarium graminearum*. *Microbiology* **151**: 3911-3921
- Fischer M, Pleiss J (2003) The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research* **31**: 319-321
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* **157**: 493-502
- Gacser A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W, Nosanchuk JD (2007a) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 4710-4718
- Gacser A, Trofa D, Schafer W, Nosanchuk JD (2007b) Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* **117**: 3049-3058
- Gao S, Choi GH, Shain L, Nuss DL (1996) Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1984-1990
- Garcia-Maceira FI, Di Pietro A, Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Roncero MI (2001) Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2191-2196

- Garcia-Maceira FI, Di Pietro A, Roncero MI (2000) Cloning and disruption of pgx4 encoding an in planta expressed exopolysaccharidase from *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 359-365
- Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S (1996) Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* **79 (Pt 2)**: 119-157
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98
- Hammond-Kosack KE, Jones JD (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 235-251
- Henrissat B, Davies G (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 637-644
- Heredia A (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta* **1620**: 1-7
- Herron SR, Benen JA, Scavetta RD, Visser J, Jurnak F (2000) Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8762-8769
- Hill CS, Treisman R (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211
- Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**: 362-374
- Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Garcia Maceira FI, Roncero MI, Di Pietro A (1999) Cloning and characterization of pl1 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* **35**: 36-40

- Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS, Davis MA (2006) Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **5**: 794-805
- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Jr., Nozawa Y, Ghannoum MA (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 1993-1998
- Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M, Yamamoto H (2001) Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 749-757
- Jackson AO, Taylor CB (1996) Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**: 315-351
- Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 390-397
- Jaeger KE, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**: 396-403
- Jans DA (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem J* **311 (Pt 3)**: 705-716
- Jenkins J, Pickersgill R (2001) The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol* **77**: 111-175
- Jia YJ, Feng BZ, Sun WX, Zhang XG (2009) Polygalacturonase, Pectate Lyase and Pectin Methylesterase Activity in Pathogenic Strains of *Phytophthora capsici* Incubated under Different Conditions. *Journal of Phytopathology* **157**: 585-591
- Karr AL, Albersheim P (1970) Polysaccharide-degrading Enzymes are Unable to Attack Plant Cell Walls without Prior Action by a "Wall-modifying Enzyme". *Plant Physiol* **46**: 69-80

- Kars I, McCalman M, Wagemakers L, JA VANK (2005) Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol Plant Pathol* **6**: 641-652
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney 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 Evol Biol* **6**: 29
- Kitamoto N, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K, Tsukagoshi N (1993) Structural features of a polygalacturonase gene cloned from *Aspergillus oryzae* KBN616. *FEMS Microbiol Lett* **111**: 37-41
- Klose J, De Sá MM, Kronstad JW (2004) Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **52**: 823-835
- Kolattukudy PE, Rogers LM, Li D, Hwang CS, Flaishman MA (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4080-4087
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* **198**: 267-284
- Lamb C, Dixon RA (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lawrence RC (1967) Microbial lipases and related esterases, Part.I: Detection, distribution and production of microbial lipases. *Dairy Sci Abstr* **29**: 1-8
- Laxalt AM, Munnik T (2002) Phospholipid signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 332-338
- Lessire R, Cahoon E, Chapman K, Dyer J, Eastmond P, Heinz E (2009) Highlights of recent progress in plant lipid research. *Plant Physiol Biochem* **47**: 443-447
- Li D, Kolattukudy PE (1997) Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys6Zn2 binuclear cluster DNA-binding motif. *J Biol Chem* **272**: 12462-12467

- Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF, Kolattukudy PE (2002) Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisii* (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem* **277**: 7905-7912
- Li Destri Nicosia MG, Brocard-Masson C, Demais S, Hua Van A, Daboussi M-J, Scazzocchio C (2001) Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **39**: 1330-1344
- Liang SD, Marmorstein R, Harrison SC, Ptashne M (1996) DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn₂ Cys₆ binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol Cell Biol* **16**: 3773-3780
- Limon MC, Rodriguez-Ortiz R, Avalos J (2010) Bikaverin production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 21-29
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lockington RA, Rodbourn L, Barnett S, Carter CJ, Kelly JM (2002) Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 190-196
- Lopez-Berges MS, A DIP, Daboussi MJ, Wahab HA, Vasnier C, Roncero MI, Dufresne M, Hera C (2009) Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Mol Plant Pathol* **10**: 95-107
- Lopez-Berges MS, Capilla J, Turra D, Schafferer L, Matthijs S, Jochl C, Cornelis P, Guarro J, Haas H, Di Pietro A (2012) HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **24**: 3805-3822
- Lorenz MC, Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83-86
- Lowe ME (1992) The catalytic site residues and interfacial binding of human pancreatic lipase. *J Biol Chem* **267**: 17069-17073

- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim WB, Woloshuk C, Xie X, Xu JR, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A, Brown DW, Butchko RA, Chapman S, Coulson R, Coutinho PM, Danchin EG, Diener A, Gale LR, Gardiner DM, Goff S, Hammond-Kosack KE, Hilburn K, Hua-Van A, Jonkers W, Kazan K, Kodira CD, Koehrsen M, Kumar L, Lee YH, Li L, Manners JM, Miranda-Saavedra D, Mukherjee M, Park G, Park J, Park SY, Proctor RH, Regev A, Ruiz-Roldan MC, Sain D, Sakthikumar S, Sykes S, Schwartz DC, Turgeon BG, Wapinski I, Yoder O, Young S, Zeng Q, Zhou S, Galagan J, Cuomo CA, Kistler HC, Rep M (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367-373
- MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 583-604
- Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MI (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* **47**: 257-266
- Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C, Brygoo Y (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**: 147-156
- Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC (1992) DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* **356**: 408-414
- Martinez-Rocha AL, Di Pietro A, Ruiz-Roldán C, Roncero MIG (2008) Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. *Molecular Plant Pathology* **9**: 293-304
- Mary Wanjiru W, Zhensheng K, Buchenauer H (2002) Importance of Cell Wall Degrading Enzymes Produced by *Fusarium graminearum* during Infection of Wheat Heads. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 803-810
- Matthews DE, Van Etten HD (1983) Detoxification of the phytoalexin pisatin by a fungal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **224**: 494-505

- McInnes AG, Walter JA, Smith DG, Wright JL, Vining LC (1976) Biosynthesis of bikaverin in *Fusarium oxysporum*. Use of ¹³C nuclear magnetic resonance with homonuclear ¹³C decoupling to locate adjacent ¹³C labels. *J Antibiot (Tokyo)* **29**: 1050-1057
- Morrissey JP, Osbourn E (1999) Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 708-724
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**: 511-517
- Moss MO, Smith JE (1984) The applied mycology of *Fusarium*. Cambridge, British Mycological Society
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Mutter M, Colquhoun IJ, Schols HA, Beldman G, Voragen AG (1996) Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-->4)-alpha-D-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiol* **110**: 73-77
- Nardini M, Dijkstra BW (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 732-737
- Nasser Eddine A, Hannemann F, Schäfer W (2001) Cloning and expression analysis of NhL1, a gene encoding an extracellular lipase from the fungal pea pathogen *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*) that is expressed in planta. *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 215-224
- Nguyen LN, Bormann J, Le GTT, Stärkel C, Olsson S, Nosanchuk JD, Giese H, Schäfer W (2011) Autophagy-related lipase FgATG15 of *Fusarium graminearum* is important for lipid turnover and plant infection. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 217-224
- Nguyen LN, Dao TT, Živković T, Fehrholz M, Schäfer W, Salomon S (2010) Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. *Enzyme and Microbial Technology* **46**: 479-486

- Nini L, Sarda L, Comeau LC, Boitard E, Dubes JP, Chahinian H (2001) Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochim Biophys Acta* **1534**: 34-44
- Noverr MC, Erb-Downward JR, Huffnagle GB (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* **16**: 517-533
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2044-2049
- Oeser B, Heidrich PM, Muller U, Tudzynski P, Tenberge KB (2002) Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genet Biol* **36**: 176-186
- Olivain C, Alabouvette C (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist* **141**: 497-510
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, Di Pietro A (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun* **72**: 1760-1766
- Osborn AE (1996) Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831
- Pan T, Coleman JE (1990) GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2077-2081
- Pareja-Jaime Y, Martin-Urdiroz M, Roncero MI, Gonzalez-Reyes JA, Roldan Mdel C (2010) Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Mol Plant Pathol* **11**: 479-493
- Pareja-Jaime Y, Roncero MI, Ruiz-Roldan MC (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 728-736

- Patino B, Posada ML, Gonzalez-Jaen MT, Martinez del Pozo A, Vazquez C (1997) Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Can J Microbiol* **43**: 1084-1090
- Perez-Nadales E, Di Pietro A (2011) The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **23**: 1171-1185
- Pickersgill R, Smith D, Worboys K, Jenkins J (1998) Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J Biol Chem* **273**: 24660-24664
- Pijning T, van Pouderooyen G, Kluskens L, van der Oost J, Dijkstra BW (2009) The crystal structure of a hyperthermoactive exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. *FEBS Lett* **583**: 3665-3670
- Pleiss J, Fischer M, Schmid RD (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* **93**: 67-80
- Pleiss J, Scheib H, Schmid RD (2000) The His gap motif in microbial lipases: a determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* **82**: 1043-1052
- Poopenitpan N, Kobayashi S, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A (2010) An ortholog of *farA* of *Aspergillus nidulans* is implicated in the transcriptional activation of genes involved in fatty acid utilization in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* **402**: 731-735
- Powell WA, Kistler HC (1990) In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J Bacteriol* **172**: 3163-3171
- Quemener B, Cabrera Pino JC, Ralet MC, Bonnin E, Thibault JF (2003) Assignment of acetyl groups to O-2 and/or O-3 of pectic oligogalacturonides using negative electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **38**: 641-648
- Ramirez MA, Lorenz MC (2009) The transcription factor homolog CTF1 regulates {beta}-oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1604-1614
- Reis H, Pfiffi S, Hahn M (2005) Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* **6**: 257-267

- Reymond-Cotton P, Fraissinet-Tachet L, Fevre M (1996) Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase pg1 gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr Genet* **30**: 240-245
- Reymond P, Deleage G, Rasclé C, Fevre M (1994) Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gene* **146**: 233-237
- Riou C, Freyssinet G, Fevre M (1992) Purification and Characterization of Extracellular Pectinolytic Enzymes Produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 578-583
- Roddick JG (1977) Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **16**: 805-807
- Rodríguez-Gálvez E, Mendgen K (1995) The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* **189**: 61-72
- Sarda L, Desnuelle P (1958) Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim Biophys Acta* **30**: 513-521
- Schjerling P, Holmberg S (1996) Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* **24**: 4599-4607
- Schrag JD, Cygler M (1997) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol* **284**: 85-107
- Shea JM, Del Poeta M (2006) Lipid signaling in pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**: 352-358
- Shieh MT, Brown RL, Whitehead MP, Cary JW, Cotty PJ, Cleveland TE, Dean RA (1997) Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3548-3552
- Singh A, Del Poeta M (2011) Lipid signalling in pathogenic fungi. *Cell Microbiol* **13**: 177-185

- Son SW, Kim HY, Choi GJ, Lim HK, Jang KS, Lee SO, Lee S, Sung ND, Kim JC (2008) Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *J Appl Microbiol* **104**: 692-698
- Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, Hube B, Schäfer W (2003) Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **22**: 347-355
- Stratilova E, Dzurova M, Markovic O, Jornvall H (1996) An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase. *FEBS Lett* **382**: 164-166
- Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* **91**: 1218-1224
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JA (1998) The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1009-1016
- Teunissen HA, Verkooijen J, Cornelissen BJ, Haring MA (2002) Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Mol Genet Genomics* **268**: 298-310
- Thomas SW, Glaring MA, Rasmussen SW, Kinane JT, Oliver RP (2002) Transcript Profiling in the Barley Mildew Pathogen *Blumeria graminis* by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 847-856
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Todd RB, Andrianopoulos A (1997) Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**: 388-405
- Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD (2000) The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12**: 237-248

- Tsitsigiannis DI, Keller NP (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* **15**: 109-118
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA (1994a) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308
- Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones TA (1994b) Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J Mol Biol* **235**: 790-792
- van der Meer-Janssen YP, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB (2010) Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog Lipid Res* **49**: 1-26
- van Pouderoyen G, Snijder HJ, Benen JA, Dijkstra BW (2003) Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **554**: 462-466
- van Santen Y, Benen JA, Schroter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, Dijkstra BW (1999) 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274**: 30474-30480
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 2**: S487-491
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, Visser RG (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**: 1781-1789
- Voigt CA, Schafer W, Salomon S (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J* **42**: 364-375
- Walters DR, Walker RL, Walker KC (2003) Lauric Acid Exhibits Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Phytopathology* **151**: 228-230
- Walton JD (1994) Deconstructing the Cell Wall. *Plant physiology* **104**: 1113-1118

- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143
- Wiebe MG (2002) Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 421-427
- Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, Bok JW, Keller NP, Humpf HU, Tudzynski B (2010) FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Microbiol*
- Wiemann P, Willmann A, Straeten M, Kleigrewe K, Beyer M, Humpf HU, Tudzynski B (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* **72**: 931-946
- Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 97-104
- Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774
- Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**: 663-670
- Wubben JP, Mulder W, ten Have A, van Kan JA, Visser J (1999) Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1596-1602
- Wubben JP, ten Have A, van Kan JA, Visser J (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr Genet* **37**: 152-157
- Yoder MD, Lietzke SE, Journak F (1993) Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure* **1**: 241-251