

# Capítulo 9

## Análisis molecular de la patogénesis en *Fusarium oxysporum*

González Roncero MI<sup>1</sup>, De la Hera C, Di Pietro A, Ruiz Roldán MC, Rispaill N, Martínez Rocha AL, Córdoba Cañero D, Martín-Urdíroz M, Prados Rosales R, Martínez Aguilera E, Pareja Jaime Y, Sánchez López-Berges M, Pérez Nadales E, De Miguel C, López-Fernández L

Dep. Genética, Campus Rabanales, Edificio Gregor Mendel C5, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba Tel: 957218981; Fax: 957212072; <sup>1</sup>CE: <ge1gorom@uco.es>

### RESUMEN

El proceso de infección del hongo *Fusarium oxysporum* es complejo y requiere algunos mecanismos bien regulados: 1) el reconocimiento de señales de la planta, 2) la adhesión a la superficie de la raíz y la diferenciación de hifas de penetración, 3) la invasión del córtex de la raíz y la degradación de barreras físicas hasta llegar al tejido vascular, 4) adaptación al entorno adverso del tejido vegetal, incluyendo la tolerancia a compuestos antifúngicos, 5) la proliferación de las hifas y producción de conidios en los vasos del xilema y, 6) la secreción de factores de virulencia tales como enzimas, péptidos o fitotoxinas.

Palabras clave: interacción planta-patógeno, señalización, factores de virulencia, factores de transcripción, pared celular, surfoma.

### Introducción

El grupo estudia los mecanismos que definen la patogénesis en los hongos filamentosos. Nuestro objetivo es descubrir nuevos genes de virulencia y entender su papel durante la infección. El interés se centra en aquellos aspectos básicos de la virulencia que están conservados en los patógenos fúngicos, sea cual sea la especie patógena y hospedadora.

En la actualidad abordamos el problema desde los siguientes enfoques: 1) Caracterización de factores de transcripción que regulen la expresión de genes relacionados con patogénesis, 2) Biogénesis de la pared celular fúngica, 3) Identificación de nuevos factores de virulencia fúngica sobre plantas y mamíferos, 4) Disección de una cascada MAP quinasa esencial para el desarrollo y la patogénesis, 5) Análisis de las proteínas de la superficie del hongo implicadas en la interacción con la planta, y 6) Análisis ultra-estructural de las primeras etapas de infección.

El proceso de infección del hongo *Fusarium oxysporum* es complejo y requiere algunos mecanismos bien regulados (Di Pietro *et al*, 2003): 1) el reconocimiento de señales de la planta, 2) la adhesión a la superficie de la raíz y la diferenciación de hifas de penetración, 3) la invasión del córtex de la raíz y la degradación de barreras físicas hasta llegar al tejido vascular, 4) adaptación al entorno adverso del tejido vegetal, incluyendo la tolerancia a compuestos antifúngicos, 5) la proliferación de las hifas y producción de conidios en los vasos del xilema y, 6) la secreción de factores de virulencia tales como enzimas, péptidos o fitotoxinas.

### Caracterización de factores de transcripción que regulen la expresión de genes relacionados con patogénesis

Para determinar el papel biológico de las enzimas líticas

de paredes vegetales se han construido mutantes deficientes en diversos genes estructurales, mediante inactivación génica dirigida ("gene knockout"). Algunos de los mutantes obtenidos de *F. oxysporum* deficientes en determinadas enzimas líticas presentan claras deficiencias de crecimiento saprofito en el sustrato correspondiente a la enzima inactivada, sin embargo ninguno de ellos ha mostrado alteración en su virulencia sobre plantas de tomate (Roncero *et al*, 2003). Por tanto, ninguno de los genes analizados es esencial por sí mismo para la patogénesis de la especie. Ello se debe a la existencia de múltiples genes de cada tipo de enzima (redundancia funcional).

Una alternativa a la anulación individual de genes estructurales ha sido el análisis de factores que regulan la expresión coordinada de un conjunto de genes implicados en la interacción patógeno-planta. Con ese objetivo hemos caracterizado a nivel molecular dos factores de transcripción del tipo dedo de zinc (XlnR y Ctf1) que median la inducción por la planta hospedadora del conjunto de genes xilanasas y cutinasas, respectivamente. Otro factor de transcripción que hemos analizado es PacC, que controla la expresión génica en respuesta al pH ambiental. PacC activa la expresión de genes "alcalinos" y reprime la de genes "ácidos. Los mutantes portadores de un alelo nulo por interrupción de su fase codificante mimetizan condiciones de acidez, y los portadores de un alelo truncado que determina una proteína PacC dominante activa, mimetizan condiciones alcalinas, independientemente del pH ambiental y muestran alteraciones en su virulencia (Caracuel *et al*, 2003a, Caracuel *et al*, 2003b).

En la actualidad estamos determinando el papel de los factores de transcripción Ste12, que actúa aguas debajo de una cascada MAP quinasa, y White Collar 1, que regula la expresión de genes inducidos por la luz que intervienen en numerosos procesos celulares, fisiológicos y del desarrollo tales como los ciclos circadianos, síntesis

de pigmentos carotenogénicos, fototropismo y esporulación.

### Biogénesis de la pared celular fúngica

Los principales componentes de las paredes celulares fúngicas son polisacáridos, entre ellos la quitina, el quitosano, el  $\beta$ -glucano y algunas proteínas. Se han descrito numerosas enzimas sintetasas de quitina en hongos filamentosos, clasificadas en seis clases (I, II, III, IV, V y VI), pudiendo existir a su vez varios genes representativos de la misma en una especie determinada. Mediante mutagénesis al azar mediada por el ADN transformante, hemos identificado un gen de *F. oxysporum* responsable de una sintasa de quitina de clase V (*chsV*) que ha resultado ser esencial para la virulencia del hongo sobre frutos y en infecciones de raíces de tomate (Madrid *et al*, 2003).

Recientemente hemos identificado cuatro nuevos genes estructurales responsables de sintetasas de quitina, denominados *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chsVb*, y un gen codificante para una chaperona sintasa, *chs7*. La caracterización fisiológica, morfológica y molecular de los mutantes portadores de cada uno de los alelos deficientes ha mostrado una pérdida total de virulencia en los mutantes defectivos  $\Delta$ *chsVb*, una ligera reducción en la virulencia de los deficientes  $\Delta$ *chs2* y ninguna en los mutantes  $\Delta$ *chs1* y  $\Delta$ *chs7* en comparación con el silvestre (Martín Urdíroz *et al*, 2004). Hemos identificado también un gen, *gas1*, responsable de una  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa implicada en virulencia (Caracuel *et al*, 2005).

### Identificación de nuevos factores de virulencia fúngica sobre plantas y mamíferos

Los hongos infectan a un amplio rango de especies eucariotas, tanto vegetales como animales. Actualmente, se desconoce hasta qué punto los mecanismos de virulencia están conservados en ambas clases de hospedadores. Nuestro grupo ha desarrollado el primer modelo "multihospedador" descrito en hongos, basado en el patógeno vascular *Fusarium oxysporum*. Experimentos llevados a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. J. Guarro de la Universitat Rovira i Virgili, han demostrado que una cepa de *F. oxysporum* patógena en tomate es capaz de causar infecciones sistémicas en ratones inmunodeprimidos.

De esta manera hemos comprobado que determinados factores, tal como la MAP quinasa Fmk1, la proteína G $\beta$  Fgb1 o el factor de transcripción PacC juegan papeles diferenciales en la infección de ambas clases de hospedadores (Ortoneda *et al*, 2004, Prados-Rosales *et al*, 2006). Actualmente estamos empleando el modelo "multihospedador" de *Fusarium* para descubrir genes de virulencia aún desconocidos, generando mutantes al azar por inserción de transposones, en colaboración con la Dra. M.J. Daboussi de la Universidad Paris-Sud. Este abordaje ya ha identificado algunos mutantes afectados en nuevos mecanismos de virulencia.

### Diseción de una cascada MAP quinasa esencial para el desarrollo y la patogénesis

La transducción de señales es el primer paso en las interacciones entre microorganismos y plantas. Actualmente se desconoce la naturaleza de las señales que activan la respuesta patogénica en los hongos. Nuestro grupo ha identificado en *F. oxysporum* una cascada de señalización regulada por una MAP quinasa, Fmk1, que es esencial para la capacidad de infectar plantas (Di Pietro *et al*, 2001). Fmk1 es una MAP quinasa ortóloga a Kss1 y ERK1, implicadas, respectivamente, en la diferenciación de pseudohifas en levaduras y en la proliferación celular y el cáncer en humanos. La interrupción dirigida del gen *fmk1* en *F. oxysporum* da lugar a mutantes que están afectados en múltiples procesos relacionados con la infección, tales como la adhesión a las raíces, la secreción de enzimas líticas o la capacidad invasora sobre tejido vegetal vivo. Dichos mutantes son, además, incapaces de llevar a cabo el proceso de fusión vegetativa entre hifas, denominado anastomosis. Actualmente estamos buscando las señales y los receptores, aún desconocidos, que activan la ruta MAP quinasa, además de los genes efectores cuya expresión está controlada por la ruta. Para ello empleamos diferentes abordajes, tanto de genética clásica como de genética inversa, de transcriptómica y de proteómica. Además estamos estudiando la activación (fosforilación) de la MAP quinasa mediante análisis Western, empleando anticuerpos específicos contra la ERK1 humana. Nuestro objetivo es, entender el funcionamiento de los componentes de la ruta MAPK en la percepción y transducción de las señales, así como definir su papel en la patogénesis fúngica.

### Análisis de las proteínas de la superficie del hongo implicadas en la interacción con la planta

El conjunto de nuestros datos apunta a un papel determinante de proteínas extracelulares o de superficie en patogénesis. Uno de nuestros objetivos prioritarios es identificar estas proteínas y definir su papel durante la infección. Para ello hemos iniciado recientemente un abordaje proteómico en colaboración con el grupo de la Dra. Concha Gil de la Universidad Complutense. El objetivo de esta línea es la identificación de proteínas ancladas en la pared o en la membrana del hongo, algunas de las cuales se expresan diferencialmente en la estirpe silvestre y el mutante  $\Delta$ *fmk1*, y la caracterización de su papel en los procesos de adhesión, invasión y virulencia de *Fusarium*. El análisis del proteoma de la superficie del patógeno, en el entorno hongo-raíz durante el inicio de la infección (*surfoma*) será de gran relevancia en el esclarecimiento de los eventos iniciales del proceso de patogénesis.

### Análisis ultra-estructural de las primeras etapas de infección

Análisis preliminares del proceso de infección de plántulas de tomate, mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión llevados a cabo en nuestro laboratorio sugieren que durante las 24 primeras horas tras la

infección las esporas de la estirpe silvestre son capaces de adherirse a la superficie de las raíces, germinar y diferenciar hifas cortas que contornean la superficie de la raíz buscando puntos de penetración. 48 horas tras la infección las hifas ya han penetrado en el interior de la raíz avanzando hacia el xilema radicular bien a través de los espacios intercelulares o atravesando célula a célula y colonizando todos sus tejidos. Análisis mediante SEM y TEM de los mutantes defectivos en patogénesis ayudarán a esclarecer el nivel del proceso de infección en el cual están interrumpidos.

### Agradecimientos

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2004-00276 y BIO2004-01240), la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia AGR-209 y Grupo PAI CVI-138) y la Unión Europea (MRTN-CT-2005-019277 SIGNALPATH).

### Referencias

- Calero-Nieto F, Di Pietro A, Roncero MI, Hera C (2007): Role of the transcriptional activator xlnR of *Fusarium oxysporum* in regulation of xylanase genes and virulence. *Mol Plant-Microbe Interac* 20: 977-985.
- Calero-Nieto F, Hera C, Di Pietro A, Orejas M, Roncero MIG (2008): Regulatory elements mediating expression of xylanase genes in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 28-34.
- Caracuel Z, Casanova C, Roncero MIG, Di Pietro A, Ramos J (2003): The pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 2: 1246-1252.
- Caracuel Z, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Madrid MP, Roncero MIG (2005): *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a  $\alpha$ -1,3-glucanotransferase required for virulence on tomato plants. *Mol Plant-Microbe Interac* 18: 1140-47.
- Caracuel Z, Roncero MIG, Espeso E, González-Verdejo C, García Maceira FI, Di Pietro A (2003): The pH response transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48: 765-779.
- Cuomo CA, Güldener 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, Münsterkötter 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.
- Delgado-Jarana J, Martínez-Rocha AL, Roldán-Rodríguez R, Roncero MIG, Di Pietro A (2005): *Fungal Genetics Biol* 42: 61-72.
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG (2003): *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 4: 315-325.
- Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MIG (2003): Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defense compounds. *Mol Microbiol* 47: 257-266.
- Martínez-Rocha AL, Roncero MI, López-Ramírez A, Mariné M, Guarro J, Martínez-Cadena G, Di Pietro A (2008): Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cellular Microbiol* 10: 1339-1351.
- Martín-Urdiroz M, Madrid MP, Roncero MIG (2004): Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiol (SGM)* 150: 3175-3187.
- Martín-Urdiroz M, Roncero MI, González-Reyes JA, Ruiz-Roldán C (2008): ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* 7: 112-121.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid M, Caracuel Z, Roncero MIG, Mayayo E, Di Pietro A (2004): *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection Immunity* 72: 1760-1766.
- Prados Rosales RC, Di Pietro A (2008): Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7: 162-171.
- Prados-Rosales RC, Serena C, Delgado-Jarana J, Guarro J, Di Pietro A (2006): Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes Infection* 8: 2825-2831.
- Roncero MIG, Hera C, Ruiz-Rubio M, García Maceira FI, Madrid MP, Caracuel Z, Calero FJ, Delgado-Jarana J, Roldán-Rodríguez R, Martínez-Rocha AL, Velasco C, Roa J, Martín Urdiroz M, Córdoba D, Di Pietro A (2003): *Fusarium oxysporum* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Mol Plant Pathol* 62: 87-98.
- Ruiz-Roldán C, Puerto-Galán L, Roa J, Castro A, Di Pietro A, Roncero MI, Hera C (2008): The *Fusarium oxysporum sti35* gene functions in thiamine biosynthesis and oxidative stress response. *Fungal Genetics Biol* 45: 6-16.