



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

**Mecanismos genéticos y moleculares
implicados en la plasticidad genómica de
*Fusarium oxysporum***

**Molecular and genetic mechanisms
underlying genome plasticity in *Fusarium
oxysporum***

Cristina López Díaz

Dirigido por:

Dr. Antonio di Pietro y Dr Manuel Sánchez López-Berges

Profesor Titular y Doctor contratado

Córdoba, junio 2019

TITULO: *MECANISMOS GENETICOS Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PLASTICIDAD GENOMICA DE FUSARIUM OXYSPORUM*

AUTOR: *Cristina López Díaz*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Mecanismos genéticos y moleculares implicados en la plasticidad genómica de *Fusarium oxysporum*

DOCTORANDO/A: Cristina López Díaz

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral de Dña. Cristina López Díaz se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, en el seno del Grupo “Genética molecular de la patogénesis fúngica” (BIO-138). Su desarrollo ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación en Genética y Biología Molecular. Durante la realización de la Tesis, Dña. Cristina ha mostrado tener una gran capacidad de trabajo y aptitud para la investigación científica. En el trabajo se ha llevado a cabo, por primera vez, un experimento extenso de evolución experimental en el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Los resultados sugieren que existe una elevada plasticidad genómica en este organismo que favorece la rápida adaptación a nuevas condiciones ambientales, incluyendo la planta huésped. Los resultados obtenidos se han comunicado en varios congresos internacionales, y una parte de ellos se ha recogido en un artículo publicado en la revista Mol. Plant Pathol.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 de Junio de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Antonio Di Pietro

Fdo.: Manuel Sánchez López Berges

Abreviaturas y acrónimos

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia ADNg: ADN genómico

ADNp: ADN plasmídico

ARN: Ácido ribonucleico

ATA: Ácido aurín-tricarboxílico, del inglés (“AurinTricarboxylic Acid”)

BCS: ácido batocuproindisulfónico sal disódica

BPS: Ácido batofenantrolinadisulfónico sal disódica

CDA: Medio Czapek-Dox agar

CDL: Medio Czapek-Dox líquido

CFW: Blanco de calcoflúor (del inglés, “CalcoFluor White”)

CNV: Variación en el número de copias (del inglés copy number variation)

DNAasa: Enzima desoxirribonucleasa

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato (del inglés, “deoxyNucleotide TriPhosphate”)

FA: Ácido fusárico (del inglés fusaric acid)

Fol 4287: *Fusarium oxysporum*

Fg: *Fusarium graminearum*

Fv: *Fusarium verticillioides*

HR: Respuesta hipersensible (del inglés, “Hypersensitive Response”)

Hygr: Casete de resistencia a higromicina

INDELS: inserciones y deleciones dentro del genoma

kb: Kilobase(s)

LA: (Medio) Luria-Bertani agar

LB: (Medio) Luria-Bertani LRR:

LS: regiones cromosómicas específicas de linaje

LTRs: repeticiones terminales largas

M: Marcador de peso molecular

MM: Medio mínimo

MMP: Medio mínimo Puhalla

MMG: Medio mínimo suplementado con glutamina

MNasa: Enzima nucleasa microcócica

(NGS: los métodos de secuenciación de segunda y tercera generación (del inglés, new generation of sequence)

ORF: Fase abierta de lectura (del inglés, "Open reading frame")

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, "Polymerase Chain Reaction")

PDA: Medio sólido de extracto de patata, D-glucosa y agar (del inglés, "Potato Dextrose Agar")

PDB: Medio líquido de extracto de patata y D-glucosa (del inglés, "Potato Dextrose Broth")

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis (del inglés "Pathogenesis Related")

RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

rpm: revoluciones por minuto

SNPs

TEs: Elementos transponibles (del inglés transposable elements)

TPEN: N,N,N',N'-Tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina

A mi familia

Índices

Índice general

Resumen vii

Abstract ix

Índice de tablas xi

Índice de Figuras xiii

Introducción

1.	Evolución	1
1.1.	Evolución experimental.....	2
1.2.	Tasa de mutación.....	4
1.3.	Dinámica de la evolución adaptativa.....	6
2.	Género <i>Fusarium</i>	9
2.1.	<i>Fusarium oxysporum</i>	10
2.2.	Ciclo de vida.....	11
2.3.	Interacción planta-patógeno.....	14
2.4.	Especialización adaptativa.....	15
2.5.	Análisis genómico de Fol 4287.....	16
3.	Mecanismos genéticos asociados a la evolución de Fol.....	18
3.1.	Elementos transponibles.....	19
3.2.	Elementos transponibles en Fol 4287.....	23
4.	Métodos de secuenciación.....	27
5.	Objetivos.....	2

Materiales y métodos

6.	Material biológico y organismos utilizados.....	6
6.1.	<i>Fusarium oxysporum</i>	6
6.2.	Huésped vegetal.....	7
6.3.	Huésped animal.....	7
7.	Vectores plasmídicos.....	7
8.	Medios de cultivo.....	8
8.1.	Medios de cultivo para crecimiento de <i>E. coli</i>	8
8.2.	Medios de cultivo para el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	8
8.3.	Compuestos químicos.....	10
9.	Crecimiento y cultivo de organismos.....	10
9.1.	<i>E. coli</i>	10
9.2.	<i>F. oxysporum</i>	11
9.2.1.	Crecimiento y recogida de microconidios.....	11
9.3.	Plantas de tomate.....	11
10.	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	12
10.1.	Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> con CTAB.....	12
10.2.	Extracción de ADN de <i>F. oxysporum</i> , método del CTAB.....	13

10.3.	Extracción de ARN de <i>F. oxysporum</i>	14
11.	Manipulación de ácidos nucleicos.....	15
11.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
11.1.1.	PCR estándar	15
11.1.2.	PCR con polimerasa de alta afinidad	16
11.1.3.	PCR de marcaje.....	16
11.1.4.	Construcción de mutantes nulos mediante Split-marker.....	17
11.1.5.	Transcripción inversa: Síntesis de ADN copia (ADNc)	19
11.1.6.	PCR en tiempo real.....	19
11.2.	Oligonucleótidos empleados.....	21
11.3.	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	26
11.3.1.	Electroforesis de ADN.....	26
11.3.2.	Electroforesis de cromosomas CHEF (Pulsed field gel)	27
11.3.3.	Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	28
11.3.4.	Transferencia y fijación de ADN de geles de agarosa a membranas de nailon (Southern blot).....	28
11.3.5.	Tratamientos con endonucleasas de restricción.....	29
11.3.6.	Clonación de fragmentos de ADN en vectores.....	29
11.4.	Cuantificación de eventos	30
11.4.1.	Cuantificación de SNPs	30
11.4.2.	Cuantificación de transposones	30
11.4.3.	Cuantificación de fragmentos	31
12.	Transformación de organismos.....	31
12.1.	Transformación de <i>E. coli</i>	31
12.1.1.	Preparación de células competentes	31
12.1.2.	Transformación.....	32
12.2.	Transformación de <i>F. oxysporum</i>	33
12.2.1.	Preparación de protoplastos para transformación	33
12.2.2.	Transformación.....	34
12.2.3.	Preparación de protoplastos para CHEF.....	36
12.2.4.	Tratamientos de protoplastos para CHEF	36
12.3.	Análisis de la estructura de la cromatina	37
13.	Experimentos de inducción de sectores	38
13.1.	Generación de variantes de crecimiento y aislamiento.....	38
13.2.	Cuantificación del número de variantes de crecimiento	40
14.	Experimentos de evolución en diferentes condiciones ambientales.....	40
14.1.	Diseño experimental general	40
14.1.1.	Identificación y nomenclatura de las muestras generadas.....	41
14.2.	Evolución en medio sólido con MM y YPGA	42
14.3.	Evolución en huésped vegetal (plantas de tomate).....	43
15.	Aislamiento monospórico	45
15.1.	Origen del aislamiento	45
1.1	Dos pasajes monospóricos	45

16.	Ensayo de competición entre la cepa silvestre y mutantes evolucionados: Simulación en 1 pasaje.....	46
16.1.	Co-inoculación en placa	46
16.2.	Co-inoculación en planta.....	46
17.	Ensayos fenotípicos.....	47
17.1.	Velocidad de crecimiento en placa.	47
17.2.	Nivel de esporulación en medio sólido	47
17.3.	Nivel de esporulación en medio líquido.....	48
17.4.	Nivel de biomasa generado.....	48
17.5.	Ensayos de crecimiento invasivo, penetración en celofán.	48
17.6.	Ensayo de toxicidad.....	49
17.6.1.	Efecto de ácido fusárico y hierro.....	49
17.6.2.	Toxicidad del Ácido fusárico en plantas de tomate.....	49
17.7.	Ensayos de patogenicidad	50
17.7.1.	Infección de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum L</i>).....	50
17.7.2.	Infección de larvas de la miel (<i>Galleria mellonella</i>).....	50
18.	Análisis bioinformáticos y software utilizado	51
18.1.	Búsqueda de secuencias en base de datos	51
18.1.1.	BLAST	51
18.2.	Análisis del genoma NGS.....	51
18.2.1.	Secuenciación	51
18.2.2.	Obtención de la secuencia de referencia	53
18.2.3.	Alineamiento de las secuencias y diseño de la “pipeline”	53
18.2.4.	Análisis y visualización de archivos generados.....	55
18.2.5.	Otras manipulaciones de secuencias	55
18.3.	Análisis estadístico	55
18.4.	Programas informáticos	56

Resultados: Capítulo 1

19.	Introducción	60
19.1.	Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) en colonias de <i>F. oxysporum</i>	61
19.2.	Aislamiento de variantes espontáneas de crecimiento.....	64
19.3.	Caracterización fenotípica de las variantes espontáneas de crecimiento.....	67
19.3.1.	Algunas variantes de crecimiento muestran mayor sensibilidad al estrés de pared y de temperatura.....	67
19.3.2.	La mayoría de las variantes crecen más rápido que el wt y muestran diferencias en el nivel de conidiación.....	69

19.3.3. Las distintas variantes muestran cambios en el crecimiento invasivo.	71
19.3.4. Ensayos de patogenicidad	73
19.4. El análisis cromosómico revela reorganizaciones en algunas variantes de crecimiento.	74

Resultados: Capítulo 2

20. Introducción	78
20.1. Diseño de los experimentos de evolución adaptativa	79
20.2. Análisis fenotípicos de las poblaciones evolucionadas tras el pasaje	
10.	82
20.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa silvestre wt.....	85
20.4. Análisis general de los cambios detectados en los genomas de las poblaciones evolucionadas.	88
20.5. Cambios genéticos detectados en cada una de las poblaciones y condiciones experimentales	91
20.5.1. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por plantas de tomate.....	95
20.5.2. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por placas de medio mínimo.....	98
20.5.3. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por placas de medio completo.....	99
20.6. Seguimiento de la dinámica de los CNVs identificados en las poblaciones evolucionadas.....	102
20.6.1. Optimización del protocolo para la detección cuantitativa de CNVs	102
20.6.2. Seguimiento de la dinámica de los CNVs durante la evolución de las poblaciones.....	104
20.7. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels durante la evolución de las poblaciones.	111
20.7.1. Método para el cálculo de frecuencias alélicas para inserciones por transposones.	111
20.7.2. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas para los SNPs.. ..	112
20.7.3. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en plantas.....	114
20.7.4. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en medio mínimo	125
20.7.1. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en medio completo.....	129

20.8. Efecto de las de las mutaciones seleccionadas sobre la "fitness" de <i>F. oxysporum</i>	134
20.8.1. Generación de mutantes <i>knockout</i> en el gen FOXG_21009.....	134
20.8.1. Generación de mutantes <i>knockout</i> en el gen <i>velB</i>	136
20.8.1. Generación de mutantes portadores del alelo truncado <i>velB C341T</i>	137
20.8.1. Ensayos fenotípicos en placa: velocidad de crecimiento y conidiación.....	138
20.8.1. Ensayos de co-inoculación de wt y cepas evolucionadas en plantas de tomate confirman la ventaja competitiva de la línea evolucionada.....	141
20.8.2. Ensayos de co-inoculación de wt y cepas evolucionadas en placas de medio completo confirman la ventaja competitiva de las líneas evolucionadas.	142

Resultados: Capítulo 3

21. Introducción	150
21.1. Efecto del pH y los nutrientes en la expresión de <i>fub1</i> y la producción de FA	151
21.2. La estructura de la cromatina en el locus <i>fub1</i> está controlada por el regulador global del metabolismo secundario <i>LaeA</i> y el factor de respuesta a pH <i>PacC</i>	153
21.3. El FA no es necesario para el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en condiciones limitantes o tóxicas de cobre, hierro o zinc	156
21.4. La toxicidad del FA en las plantas de tomate se revierte mediante la aplicación exógena de cobre, hierro y zinc	158

Resultados: Capítulo 4

22. Introducción	164
22.1. Obtención de aislados monospóricos a partir de las poblaciones del pasaje 10 de la evolución experimental y su genotipado.	165
22.2. Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados.....	167
22.2.1. Fenotipos de los aislados evolucionados en plantas.....	169
22.2.1. Fenotipos de los aislados evolucionados en medio mínimo	175
22.2.2. Resultados para los aislados seleccionados en la condición experimental de medio completo.	179
23. Discussion.....	190
23.1. Rationale and initial setup of the experimental evolution experiment.	190
23.2. Dynamics of adaptive evolution in <i>F. oxysporum</i>	192
23.3. Particularities of the experimental condition in minimal medium ..	198
23.4. Role of transposons in evolution	199

23.5. Analysis of monosporic isolates	202
23.6. Fusaric acid	203
24. Conclusions	210
25. Bibliografía	214

Resumen

Los patógenos fúngicos representan una grave amenaza para la salud humana y la seguridad alimentaria. *Fusarium oxysporum* es un hongo filamentoso que causa marchitez vascular en más de cien cultivos diferentes y es conocido por su amplia distribución ecológica a nivel mundial. A pesar de carecer de reproducción sexual conocida, posee una extraordinaria plasticidad genética. Reconocido como primer modelo fúngico de patógeno multihospedador, tiene la capacidad de infectar organismos tanto del reino vegetal como animal, en este último caso como patógeno oportunista. Esta gran variabilidad le permite adaptarse y colonizar nichos muy diferentes convirtiéndolo en un organismo ideal para estudiar mecanismos genéticos adaptativos.

En este estudio se llevaron a cabo experimentos de evolución experimental de *F. oxysporum* en tres condiciones distintas: infección de plantas, placas de medio mínimo y placas de medio completo. Con ello se pretendía estudiar, como la presión selectiva ejercida por estas condiciones ambientales impulsara cambios genéticos que pudieran manifestarse a nivel fenotípico. A partir de la cepa original clónica 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se obtuvieron 5 líneas independientes evolucionadas en cada condición mediante diez pasajes seriados.

La re-secuenciación del genoma de las poblaciones evolucionadas tras el último pasaje reveló la presencia de grandes duplicaciones segmentarias y deleciones en regiones accesorias del genoma, incluida la pérdida parcial de cromosomas. Además, se detectaron numerosas inserciones de transposones, así como algunos cambios de un solo nucleótido (SNPs) y pequeñas inserciones o deleciones (Indels). El seguimiento de estos eventos a lo largo del experimento, a través de diversas técnicas moleculares, permitió establecer la dinámica evolutiva

dentro de las poblaciones, relacionada con la competitividad relativa de las mutaciones múltiples propagadas simultáneamente.

Algunas de las poblaciones evolucionadas mostraron notables diferencias fenotípicas con respecto al aislado inicial, incluyendo cambios en la sensibilidad a estreses, crecimiento invasivo y virulencia en plantas y animales. En las poblaciones evolucionadas en medio completo se encontraron dos mutaciones recurrentes, seleccionadas en múltiples líneas de manera independiente. Los genes afectados fueron FOXG_21009 de función desconocida y FOXG_00016 (*ve1B*) que codifica un componente de Velvet, un complejo proteico regulador del desarrollo y metabolismo secundario. La caracterización de aislados monospóricos portadores de estas mutaciones, además de la generación de mutantes nulos, reveló un incremento significativo en la velocidad de crecimiento y en la capacidad de conidiación bajo las condiciones de evolución experimental. Además, se ha estudiado el papel de uno de los metabolitos secundarios regulados por Velvet, el ácido fusárico, en la infección de plantas de tomate y del hospedador invertebrado *Galleria mellonella*.

En resumen, los resultados del presente trabajo sugieren que la plasticidad del genoma, particularmente mediante el efecto de los transposones, actúa como un importante impulsor evolutivo en *F. oxysporum*, y que la adaptación al huésped implica ajustes compensatorios entre distintos programas de desarrollo que promueven la infección frente a la proliferación.

Abstract

Fungal pathogens represent a serious threat to human health and food security. *Fusarium oxysporum* is a filamentous fungus that causes vascular wilt disease in more than a hundred different crops and is known for its wide ecological distribution worldwide. Although it lacks a known sexual cycle, *F. oxysporum* displays a striking genetic plasticity. Recognized as the first fungal multi-host pathogen model, it infects organisms from both the plant and the animal kingdom, in the latter case as an opportunistic pathogen. Its variability allows it to adapt and colonize a wide range of different niches, making it an ideal organism to study genetic mechanisms underlying adaptation.

In this study we conducted experimental evolution experiments with *F. oxysporum* under three different conditions: plant infection, growth on minimal and on complete medium. The goal was to understand how the selective pressure exerted by these different environmental conditions drives genetic change and affects phenotype. Starting from the clonal isolate *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, we obtained 5 independent lines evolved in each condition through ten serial passages.

Genome re-sequencing of the evolved populations after the last passage revealed the presence of large segmental duplications and deletions in accessory regions of the genome, including partial loss of chromosomes. We also detected numerous transposon insertion, as well as single nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions or deletions (Indels). Monitoring these events throughout the experiment by various molecular techniques allowed to establish the evolutionary dynamics within the populations as a function of the relative competitiveness of the multiple mutations propagated simultaneously.

Some evolved populations showed remarkable phenotypic differences with respect to the initial isolate including changes in sensitivity to stresses,

invasive growth and virulence on plant and animal hosts. In the populations evolved on complete medium, two recurrent mutations were selected independently in several lines. The affected genes were FOXG_21009 with unknown function and FOXG_00016 (*velB*) encoding a component of Velvet, a protein complex that regulates development and secondary metabolism. The characterization of monosporic isolates carrying these mutations, as well as the generation of deletion mutants, revealed a significant increase in growth speed and conidiation capacity under the conditions of experimental evolution. In addition, we analyzed the role of fusaric acid, one of the secondary metabolites regulated by Velvet, during infection of tomato plants and of the invertebrate host *Galleria mellonella*.

In summary, the results of this work suggest that genome plasticity, in particular associated with transposons, acts as a potent evolutionary driver in *F. oxysporum*, and that host adaptation implies trade-offs between different development programs promoting infection versus proliferation.

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de transposones encontrados en el cromosoma patogénico 14 de la cepa Fol 4287. Modificado de Schmidt et al, 2013	25
Tabla 2. Cepas fúngicas utilizadas	6
Tabla 3. Vectores de clonación	7
Tabla 4. Soluciones empleadas en distintos ensayos fenotípicos.....	10
Tabla 5. Condiciones de amplificación para PCR estándar	15
Tabla 6. Condiciones de amplificación para PCR.....	16
Tabla 7. Condiciones de amplificación de la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión génica	20
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para realización de mutantes y expresión.	22
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para cuantificación de CNVs	22
Tabla 10. Oligonucleótidos usados para detección de indels	23
Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para la detección de SNPs	24
Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para detección de transposones	25
Tabla 13 Poblaciones seleccionadas para hacer el análisis por secuenciación Illumina.....	52
Tabla 14. Programas informáticos usados para el análisis de datos en este trabajo.	56
Tabla 15. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en plantas clasificadas por su posición relativa respecto al gen..	96
Tabla 16. Resumen de los genes en las poblaciones evolucionadas en plantas que muestran eventos en la región codificante (CDS) o <1000 pb aguas arriba del gen.	97
Tabla 17. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en placas de medio mínimo clasificadas por su posición relativa respecto al gen.....	98
Tabla 18. Resumen de los genes en las poblaciones evolucionadas en placas de medio mínimo que muestran eventos en la región codificante (CDS) o <1000 pb aguas arriba del gen.	99
Tabla 19. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en plantas clasificadas por su posición relativa respecto a los genes.	100

Tabla 20. Se muestran los genes eliminados en la deleción.	123
Tabla 21. Se muestran los genes eliminados en la deleción.	125
Tabla 22. Se muestran los genes eliminados en la deleción	128
Tabla 23. Aislados monospóricos seleccionados a partir de las distintas líneas y condiciones de evolución experimental. Arriba se indican los números identificativos de los genes afectados por las mutaciones diferenciales caracterizadas.	166
Tabla 24 Resumen de los resultados de los ensayos fenotípicos con 11 aislados monospóricos obtenidos a partir de distintas líneas evolucionadas en plantas de tomate.	170
Tabla 25. Resumen de los resultados fenotípicos de los distintos aislados analizados obtenidos a partir del ultimo pasaje de la evolución experimental en medio mínimo.	175
Tabla 26. Resumen de los resultados fenotípicos de los distintos aislados analizados obtenidos a partir del ultimo pasaje de la evolución experimental en medio completo.	180

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de evolución experimental que originan diferentes dinámicas genéticas.	3
Figura 2. Dinámica genética en experimentos de evolución con poblaciones asexuales.	8
Figura 3. Tipos de esporas de <i>Fusarium</i>	11
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Furarium oxysporum</i>	12
Figura 5. Estadios de la infección de <i>Fusarium oxysporum</i> . <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> expresando la proteína verde fluorescente (GFP), infectando plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).	13
Figura 6. Vista global de la sintenia entre <i>F. oxysporum</i> y <i>F. verticillioides</i> junto con la distribución de elementos transponibles.	17
Figura 7. Clases de elementos móviles.	22
Figura 8. Esquema de interrupción génica mediante la técnica Split Marker (Catlett et al, 2003).	18
Figura 9. Aislamiento de variantes de crecimiento a partir de una colonia de la cepa clonal wt en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno.	39
Figura 10. Diseño general de evolución experimental utilizado para las tres condiciones (planta, medio completo, medio mínimo).	41
Figura 11. Evolución experimental mediante pasajes seriados a través de medio mínimo (M) o medio completo YPGA (Y).	42
Figura 12. Evolución experimental mediante pasajes seriados a través de plantas de tomate.	44
Figura 13. Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) observados en colonias de distintos aislados de <i>F. oxysporum</i>	62
Figura 14. Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) observados en colonias de la cepa silvestre 4287 (wt) y de distintos mutantes nulos de la misma.	64
Figura 15. Fenotipo de colonia de distintas variantes de crecimiento, aisladas a partir de la cepa silvestre crecida en Medio Mínimo Puhalla con distintas fuentes de nitrógeno.	66
Figura 16. Sensibilidad de los distintos fenotipos de variantes de crecimiento a estrés de pared.	68
Figura 17. Sensibilidad de los distintos tipos de variantes de crecimiento al estrés de temperatura alta.	69
Figura 18. Velocidad de crecimiento de las distintas variantes.	70
Figura 19. Producción de microconidios en los distintos tipos de variantes.	71
Figura 20. Capacidad de penetración de membranas de celofán de los distintos tipos variantes.	72
Figura 21. Virulencia de algunos tipos de variantes en plantas de tomate y en larvas de la miel (<i>Galleria mellonella</i>).	74

Figura 22. Cariotipo de cepas representativas de algunos de los tipos de variantes de crecimiento obtenidas a partir de la cepa silvestre de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> Fol4287.	75
Figura 23. Esquema general del experimento de evolución experimental.	80
Figura 24. Virulencia en tomate de las poblaciones obtenidas tras la evolución experimental.	83
Figura 25. Virulencia en larvas de la miel (<i>Galleria mellonella</i>) de las poblaciones obtenidas tras la evolución experimental.....	84
Figura 26. Disposición de los cromosomas de la cepa wt de <i>F. oxysporum</i>	87
Figura 27 Distribución de los cambios genéticos detectados en las poblaciones obtenidas en las tres condiciones de evolución experimental.	89
Figura 28. Tipos de cambios genéticos detectados en las poblaciones obtenidas en las tres condiciones de evolución experimental.	90
Figura 29. Distribución de los eventos encontrados en las 15 poblaciones secuenciadas por illumina.....	95
Figura 30. Esquema del recuento de lecturas de una región genómica cuyo número de copias se deduce mediante el análisis de CNVs.	103
Figura 31. Dinámica evolutiva del CNV en el cromosoma 13 a lo largo de la evolución experimental.....	105
Figura 32. Dinámica evolutiva del CNV en el cromosoma 13 a lo largo de la evolución experimental.....	106
Figura 33. Dinámica evolutiva del CNV en región 1&15 a lo largo de la evolución experimental.	109
Figura 34. Dinámica evolutiva del CNV en región 3&6 a lo largo de la evolución experimental.	110
Figura 35. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas en la población de las inserciones por transposones.	112
Figura 36. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas de los SNPs mediante la técnica RFLP.....	113
Figura 37. Dinámica evolutiva de los eventos indicados a lo largo de la evolución experimental en la línea P1.....	114
Figura 38. Dinámica evolutiva de los eventos indicados a lo largo de la evolución experimental en la línea P2.....	116
Figura 39. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P4.....	117
Figura 40. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P5.....	119
Figura 41. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P3.....	121
Figura 42. Dinámica evolutiva de la delección de 28 Kb en el cromosoma 7 en la línea mezclada P3+P5.....	123
Figura 43. Dinámica evolutiva de la delección de 38 Kb en el cromosoma 7 seleccionada en la línea mezclada P3+P5.	124

Figura 44. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en las poblaciones evolucionadas en medio mínimo.....	126
Figura 45. Dinámica evolutiva de la delección de 35 Kb seleccionada en la línea M3.	128
Figura 46. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea Y1.....	129
Figura 47. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en las líneas Y2-Y5.	131
Figura 48. Dinámica evolutiva de la doble delección en los cromosomas parciales S_3 y S_6 seleccionada en la línea Y3.	132
Figura 49. Eventos detectados en los genes FOXG_21009 y FOXG_00016 en distintas líneas evolucionadas en medio completo.	133
Figura 50. Delección dirigida del gen FOXG_21009 en <i>F. oxysporum</i>	135
Figura 51. Delección dirigida del gen <i>velB</i> (FOXG_00016) en <i>F. oxysporum</i>	137
Figura 52. Introducción ectópica del alelo <i>velB C341T</i> en la cepa silvestre.....	138
Figura 53 Las mutaciones en FOXG_21009 y <i>velB</i> aumentan, respectivamente, la velocidad de crecimiento y la conidiación en las condiciones del experimento de evolución.....	140
Figura 54. Los pasajes sucesivos a través de plantas de tomate aumentan la competitividad en la colonización.....	142
Figura 55. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y aislados evolucionados de la línea Y4 en placas de medio completo.	144
Figura 56. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y aislados evolucionados de la línea Y2 en placas de medio completo.	145
Figura 57. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y mutantes $\Delta velB$ en placas de medio completo.	146
Figura 58. El pH y la composición del medio regulan los niveles de transcripción de <i>fub1</i> y la producción de FA.....	152
Figura 59. La transcripción de <i>fub1</i> está regulada por <i>LaeA</i>	154
Figura 60. <i>LaeA</i> , pH y <i>PacC</i> regulan las modificaciones de la cromatina en el locus <i>fub1</i>	155
Figura 61. La expresión de <i>fub1</i> es reprimida por cobre, hierro y zinc.....	157
Figura 62. El efecto fitotóxico del FA en las plantas de tomate disminuye mediante la adición de cobre, hierro o zinc.	159
Figura 63. El quelante de zinc permeable a la membrana TPEN causa síntomas de fitotoxicidad similares al FA en las plantas de tomate.....	160
Figura 64 Caracterización fenotípica de los aislados monospóricos en placas con distintos medios de cultivo (YPGA, MM y PDA).	168
Figura 65 Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta.	172
Figura 66. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta. ...	172

Figura 67. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta muestran crecimiento invasivo a pH 5.....	173
Figura 68. Ensayo de infección en plantas de tomate (cultivar Mónica).	174
Figura 69. Ensayo de infección en larvas del gusano de la miel (<i>Galleria mellonella</i>).....	174
Figura 70. Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio mínimo.....	177
Figura 71. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio mínimo.	177
Figura 72. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta muestran crecimiento invasivo a pH 5.....	178
Figura 73. Supervivencia de plantas de tomate (cultivar Mónica).....	178
Figura 74. Ensayo de infección en larvas del gusano de la miel (<i>Galleria mellonella</i>).....	179
Figura 75. Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo.....	182
Figura 76. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo.	183
Figura 77. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo muestran crecimiento invasivo a pH 5.	184
Figura 78. Ensayo de infección en plantas de tomate (cultivar Mónica).	185
Figura 79. Índice de supervivencia de larvas de la miel (<i>Galleria mellonella</i>) ...	185

Introducción

1. Evolución

En 1859, Charles Darwin describió en su famoso libro “El origen de las especies”, que determinados rasgos físicos conferirían a los individuos que los portaban una mejor adaptación a las condiciones ambientales y por tanto mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse. Entender los fenómenos ecológicos que intervienen en la evolución es profundamente complejo debido a la interacción de factores bióticos y abióticos íntimamente asociados a este proceso. Es aquí donde surge el concepto de nicho ecológico, que se define como la posición relacional o funcional de una especie o población en un ecosistema condicionada por el hábitat y las condiciones ambientales.

Aunque Darwin aplicó esa idea a la naturaleza, **nunca pudo explicar cuál es el origen de las especies** porque no llegó a entender qué es lo que mueve el motor de la evolución que suele ser un proceso muy lento. **Hoy sabemos que la causa son las mutaciones genéticas.** Además, conocemos casos de evolución a cámara rápida, como el de las bacterias que en un periodo de tiempo relativamente corto se vuelven resistentes a los antibióticos. Por lo tanto, son las condiciones ambientales y ecológicas las que determinan, cuáles de las mutaciones espontaneas que pudieran generarse en un individuo presentan una ventaja frente al resto, lo hacen más competitivo en ese hábitat y acabarán fijándose en la población en las generaciones siguientes.

Comprender los mecanismos por los que surgen estas mutaciones y el papel en la evolución adaptativa plantea una serie de interrogantes que se han tratado de explicar a nivel científico desde diversas perspectivas. Una de ellas ha sido el análisis filogenético a través de muestras ancestrales de una población. Su estudio mediante genes conservados proporciona una visión parcial de lo que sucedió a lo largo de la evolución en una determinada especie o un grupo de especies (Brocchieri, 2001; Yang & Rannala, 2012). Sin embargo, para poder

estudiar las dinámicas poblacionales en sistemas controlados y más simples, ha sido sumamente útil el uso de la evolución experimental (Barrick & Lenski, 2013).

1.1. Evolución experimental.

En los estudios de evolución experimental, las poblaciones de organismos se mantienen en una condición controlada, donde se pueden observar los cambios tanto en el genotipo como en el fenotipo dentro de una escala temporal definida que abarca muchas generaciones (Garland & Rose, 2009; Kawecki, *et al*, 2012; Barrick & Lenski, 2013). Llevar la evolución al laboratorio presenta importantes ventajas asociadas al hecho de poder generar un registro de muestras a lo largo del proceso para su posterior estudio. Gracias a este registro podemos conocer si un resultado particular estaba supeditado a algún evento anterior e incluso enfrentar un ancestro con sus propios descendientes, con todas las ventajas que ello supone a la hora de interpretar los resultados generados.

La mayoría de los estudios de evolución experimental comienzan con una población clonal o consanguínea de un organismo modelo, de modo que existe un punto de partida genético homogéneo y bien caracterizado. De esta manera, conocer las tasas en las que surgen nuevas mutaciones, junto con la diversidad fenotípica en una población, nos ayuda a comprender la dinámica evolutiva. Concretamente, los experimentos de acumulación de mutaciones permiten estimar las tasas de mutación intrínsecas de un organismo y analizar los efectos de éstas mutaciones imponiendo repetidamente cuellos de botella poblacionales en uno o unos pocos individuos elegidos. En este punto se hace imprescindible que el cuello de botella se realice de manera aleatoria para minimizar el sesgo producido por un menor número de individuos reproductores en la siguiente generación (Halligan & Keightley, 2009). Dentro de los experimentos de evolución se pueden distinguir principalmente dos tipos, según la mecánica y el

mantenimiento en las poblaciones experimentales: los de acumulación de mutaciones y los de evolución adaptativa (Figura 1) (Barrick & Lenski, 2013).

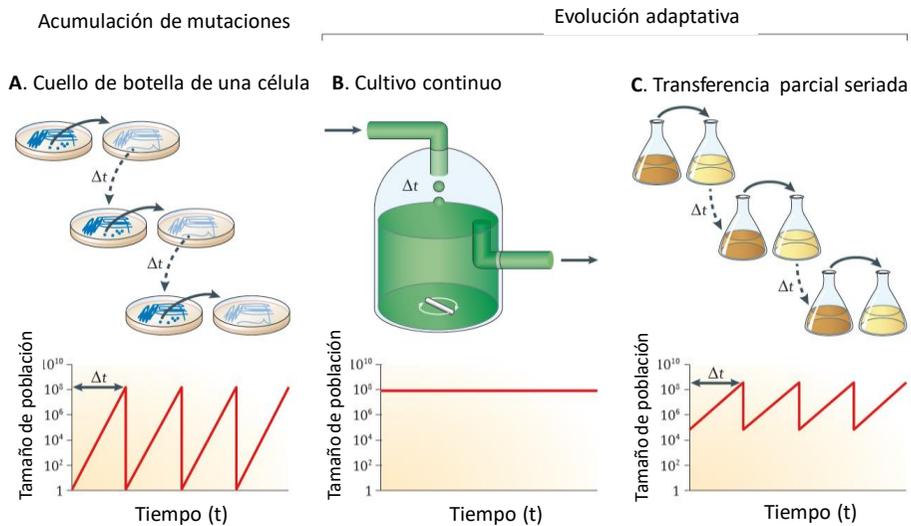


Figura 1. Tipos de evolución experimental que originan diferentes dinámicas genéticas. (A) Experimento de acumulación de mutaciones donde los cuellos de botella se realizan a través de uno o unos pocos individuos reproductores elegidos al azar (B) Dentro de la evolución adaptativa encontramos experimentos con cultivo continuo, donde las poblaciones se mantienen en condiciones constantes de flujo de nutrientes y de salida aleatoria de individuos; o (C) experimentos de transferencia en serie, donde una proporción de la población se transfiere periódicamente a un medio nuevo. En cada tipo de configuración, se muestran los cambios representativos en el tamaño de la población a lo largo del tiempo (panel inferior). Adaptado de (Barrick, *et al* 2013).

En los experimentos de acumulación de mutaciones, los cuellos de botella son frecuentes y deliberados dentro de la población que se está analizando. Las poblaciones son forzadas continuamente a través de uno o unos pocos individuos, por lo que la probabilidad de que una mutación determinada sobreviva es esencialmente aleatoria e independiente. Estos cuellos de botella purgan la diversidad genética y conducen a la fijación de mutaciones arbitrarias sin tener en cuenta sus efectos sobre la capacidad de adaptación (Figura 1A). Bajo estas condiciones específicas, se puede simplemente contar el número de cambios genéticos presentes en los genomas evolucionados durante un número

conocido de generaciones para estimar **la tasa de mutación espontánea** dentro del estudio poblacional.

Por el contrario, en los experimentos de evolución adaptativa las poblaciones generadas están condicionadas por la diversidad genética y su supervivencia en una determinada condición ambiental, así como por el sistema de crecimiento seleccionado.

Cuando se realizan cultivos continuos (Figura 1B), las poblaciones se mantienen en condiciones de entrada constante de nutrientes y salida de individuos y desechos aleatoria, por ejemplo, a través de un quimiostato. En este caso, las poblaciones mantienen un tamaño casi constante a lo largo del tiempo que dura el proceso. En los experimentos de transferencia en serie, una proporción de la población se transfiere periódicamente a un nuevo medio que puede ser agotado o no antes del siguiente pasaje. En esta clase de experimentos evolutivos se realiza un cuello de botella con muestras representativas de la población, donde se mantiene constante el número de individuos de inicio después de cada transferencia.

1.2. Tasa de mutación.

La genética de poblaciones ha desarrollado un sofisticado marco matemático para medir las tasas de cambio evolutivo dentro de los principales procesos de mutación como la recombinación, la deriva genética (Hartl & Clark, 2007) donde está implicada la selección natural. Este sistema permite comprender de manera general los regímenes evolutivos y su dinámica, pero no su relación con detalles moleculares de un genoma particular tales como las vías metabólicas, regulatorias y de desarrollo.

El número de los cambios genéticos que se acumulan en un determinado linaje a lo largo del tiempo se denomina **la tasa de mutación**. Este parámetro

refleja la probabilidad de un cambio en el genoma entre la línea de inicio y su descendencia.

En los experimentos de acumulación de mutaciones, la probabilidad de que una mutación determinada sobreviva debe ser esencialmente aleatoria e independiente de una posible mejora en la capacidad de supervivencia. Por lo tanto, todas las mutaciones, excepto las letales o extremadamente perjudiciales, se acumulan en tasas cercanas a las de mutación subyacentes. El número total de mutaciones altamente desfavorables se suele considerar pequeño y, por lo tanto, es común equiparar las tasas observadas con las de mutación en experimentos de acumulación de mutaciones, aunque esto suponga subestimar ligeramente la verdadera tasa de mutación.

Por el contrario, en los experimentos de evolución adaptativa se seleccionan aquellas mutaciones dentro de la población que confieren una ventaja en las condiciones experimentales utilizadas. Los linajes con estas raras mutaciones aumentan su frecuencia a medida que superan a sus ancestros. Por el contrario, las mutaciones deletéreas están subrepresentadas en los experimentos de evolución adaptativa ya que generalmente se eliminan por selección.

En general, las mutaciones pueden clasificarse como beneficiosas, neutras, perjudiciales o letales si se tiene en cuenta su efecto sobre la capacidad biológica en la condición experimental ensayada (Loewe. & Hill, 2010). Sin embargo, es importante recordar que en los experimentos de evolución adaptativa cada nueva mutación puede alterar la trayectoria de las mutaciones ya existentes. Es por esta razón que la interpretación de los resultados de evolución adaptativa necesita de un estudio más profundo.

1.3. Dinámica de la evolución adaptativa.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los experimentos de evolución adaptativa generan dinámicas diferenciales en la supervivencia y la reproducción del organismo, conduciendo así a la acumulación de variantes genéticas mejor adaptadas al entorno. Podemos asumir, que una típica mutación beneficiosa produce una optimización celular respecto a los niveles de expresión génica, reajustes dentro de rutas reguladoras o alteraciones en flujos metabólicos. Estos ajustes pueden ser beneficiosos simplemente porque reducen la expresión y, por lo tanto, los costes energéticos de las funciones no utilizadas. En función del momento en el que surge una determinada mutación y del modo en que se fija en la población podemos distinguir dos tipos: 1) mutaciones beneficiosas tempranas, consideradas de mayor efecto debido que suelen afectar mecanismos generales de control; y 2) mutaciones beneficiosas posteriores, que suelen incidir en rutas más específicas (Philippe *et al*, 2007; Conrad *et al*, 2011; Yang *et al*, 2011; De Visser *et al*, 2011). Aunque estas mutaciones puedan ser beneficiosas, su incorporación dentro de la población se realizará de manera gradual si la mejora del rendimiento no es sustancial. Por otro lado, cuando las mutaciones beneficiosas producen cambios más repentinos y dramáticos suelen considerarse como innovaciones que permiten que el organismo pueda, por ejemplo, ocupar un nuevo nicho ecológico (Wagner, 2011). Las innovaciones pueden surgir a partir de efectos de epístasia (De Visser *et al*, 2011; Meyer *et al*, 2012), es decir, pueden producirse inicialmente varias mutaciones que, por sí mismas, tienen poco o ningún efecto sobre el rasgo, pero este fondo genético evolucionado es necesario para que alguna mutación "clave" produzca la novedad fenotípica.

En poblaciones sexuales se puede romper el vínculo entre distintas mutaciones de una generación a otra, si la recombinación es lo suficientemente frecuente para asegurar que cada una se seleccione de forma independiente (Peters & Otto, 2003). Por el contrario, en poblaciones asexuales, los destinos de

las mutaciones están estrechamente entrelazados. Esto significa que el destino de cada mutación beneficiosa depende de una serie de parámetros, como la tasa de mutación, el tamaño de la población y la mejora física resultante. Todo esto condiciona la propagación de las mutaciones dentro de la población donde se originan (Gerrish & Lenski, 1998; Wilke, 2004; Desai & Fisher, 2007; Fogle, *et al* 2008; Rouzine, *et al* 2008; Land, *et al* 2011).

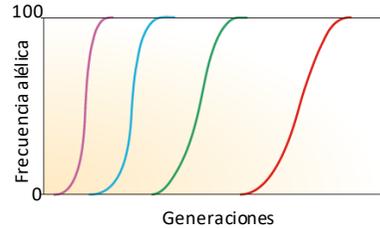
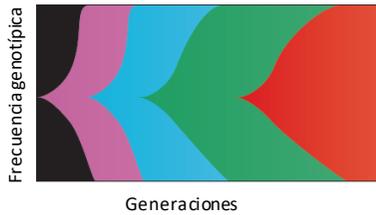
Según de la dinámica evolutiva de las poblaciones asexuales podemos definir tres tipos de regímenes en función de la tasa de mutación, su frecuencia y modo de propagación. En la selección periódica, cada mutación aumenta su frecuencia hasta desplazar completamente a su antecesor dentro de la población y antes de que surja otra nueva mutación (Figura 2A). Por otro lado, la velocidad a la que surgen las mutaciones beneficiosas puede ser lo suficientemente alta para que, antes de que una llegue a fijarse en la población, otra aparezca en un linaje distinto. Este fenómeno se conoce como "interferencia clonal" o "efectos de mutación múltiple" (De Visser, *et al* 1999; Miralles, *et al* 1999; Joseph & Hall, 2004; De Visser & Rozen, 2006; Desai, *et al* 2007; Gresham, *et al* 2008; Kao & Sherlock, 2008; Miller, *et al* 2011). Se caracteriza por la competición entre linajes portadores de diferentes mutaciones beneficiosas, pudiéndose producir una disminución en la velocidad de fijación de un alelo particular comparado con una población que recombina libremente.

Dentro de los modelos de reproducción asexual destacan los realizados con microorganismos, por la facilidad que implica su manejo en condiciones controladas de laboratorio. Este es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un modelo eucariota estudiado en profundidad durante miles de generaciones, en poblaciones con alta o baja concentración de individuos. El estudio de la dinámica evolutiva en estas poblaciones, incluyendo el de las frecuencias genéticas analizadas dentro de las distintas generaciones, permitió distinguir fenómenos claros de interferencia clonal, donde determinadas

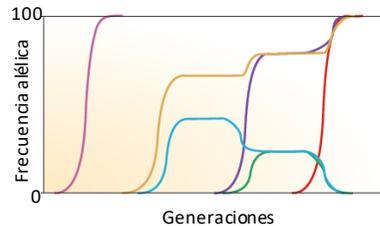
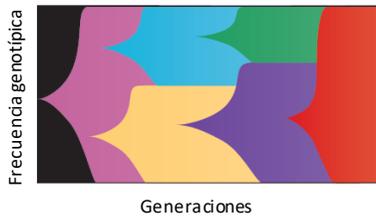
mutaciones surgidas anteriormente desaparecen tras la competición con mutaciones surgidas posteriormente (Lang, *et al* 2013).

Reproducción asexual

A. Selección periódica



B. Interferencia clonal



C. Selección fuerte

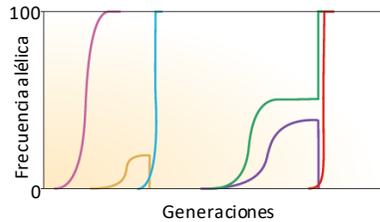
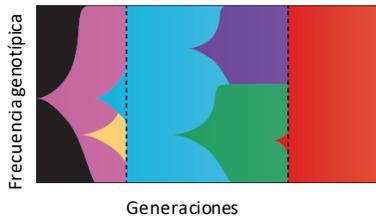


Figura 2. Dinámica genética en experimentos de evolución con poblaciones asexuales.

Se muestran tres posibles escenarios utilizando gráficos de Muller (paneles de la izquierda) o de línea (derecha). **(A)** Si la velocidad a la que surgen las nuevas mutaciones beneficiosas es baja y el beneficio es elevado, una mutación determinada se fijará en la población en cada momento. **(B)** La interferencia clonal se produce cuando surgen múltiples mutaciones beneficiosas antes de que una de ellas logre fijarse. **(C)** La selección fuerte se impone periódicamente, de manera que incluso puede ser letal para la mayoría de la población (mostrada por líneas verticales discontinuas); posteriormente solo uno o unos pocos genotipos logran fijarse. Adaptado de (Barrick, 2013).

Los trabajos de evolución experimental en levadura pusieron por primera vez el foco en las trayectorias evolutivas de mutaciones surgidas y seleccionadas bajo determinadas condiciones experimentales. No obstante, al tratarse de un modelo fundamentalmente unicelular, los estudios con *S. cerevisiae* pueden ser

insuficientes a la hora de comprender la dinámica más compleja en hongos multicelulares. Por lo tanto, es fundamental implementar la información hasta ahora obtenida en sistemas modelo para seguir avanzando en la comprensión de la evolución adaptativa. Es te ha sido el objetivo del presente trabajo de evolución experimental en *Fusarium oxysporum*, un patógeno multi-hospedador utilizado en el presente estudio. Sin duda, este tipo de abordaje puede revelar nuevos mecanismos en poblaciones cuya diversidad genética se produce en ausencia de reproducción sexual.

2. Género *Fusarium*.

El género *Fusarium*, dentro del cual encontramos la especie *oxysporum*, es extenso y heterogéneo. Perteneciente a la división de los ascomicetos, su amplia distribución y adaptación a múltiples condiciones ambientales, tanto de suelos naturales como cultivados, lo identifican como uno de los géneros fúngicos que más pérdidas económicas generan en numerosos cultivos de interés. El género *Fusarium* incluye un gran número de especies, tales como *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* o *F. solani* entre otras. Muchas de ellas son fitopatógenas, causando marchitez vascular o produciendo toxinas letales (Moss & Smith, 2011). También incluye estirpes no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluidos humanos inmunocomprometidos (Ortoneda, *et al* 2004; Vartivarian, *et al* 1993). Algunas especies que se utilizan para el control biológico de plagas, la producción de metabolitos secundarios de interés comercial como la ciclosporina o las giberelinas (Desjardins, *et al* 1993), o la obtención de biomasa fúngica para la elaboración de una amplia gama de alimentos (Wiebe, 2002).

Fusarium incluye tanto especies que pueden completar el ciclo sexual como otras aparentemente asexuales. Su complejidad taxonómica ha provocado que históricamente las formas teleomórficas fueran consideradas géneros

distintos, como *Albonectria*, *Gibberella* o *Haematonectria* (Leslie & Summerell, 2006), debido a que sus estructuras reproductivas son muy diferentes a las producidas por las estirpes asexuales. A esto hay que añadir la gran variabilidad en multitud de caracteres fenotípicos que a menudo se ven afectados por las condiciones de cultivo. (Hennequin, *et al* 1997; Hue, *et al* 1999).

Dentro de los patógenos de este género, *F. oxysporum* se ha establecido como un excelente modelo de experimentación gracias a su facilidad de cultivo y manejo en el laboratorio, junto con la posibilidad de estudiar tanto el proceso de infección en plantas como en animales (Ortoneda, *et al* 2004).

2.1. *Fusarium oxysporum*.

Fusarium oxysporum se describe como un patógeno de plantas, con hifas hialinas y septadas, y sin ciclo sexual conocido. Capaz de parasitar más de 120 cultivos diferentes (Dean *et al*, 2012), puede causar además infecciones en personas inmunodeprimidas (Nucci & Anaissie, 2007). Así, *F. oxysporum* fue propuesto hace años como el primer modelo de patógeno multihospedador en hongos (Ortoneda *et al*, 2004).

El micelio es típicamente de textura algodonosa y color blanco, aunque puede variar desde el rosa pálido hasta el púrpura oscuro, según el aislado y las condiciones ambientales, que también pueden afectar a la velocidad de crecimiento, la forma, tamaño y abundancia de las esporas. (Booth, 1971). Se han descrito tres tipos de esporas asexuales en esta especie: Microconidios, macroconidios y clamidosporas (Figura 3).

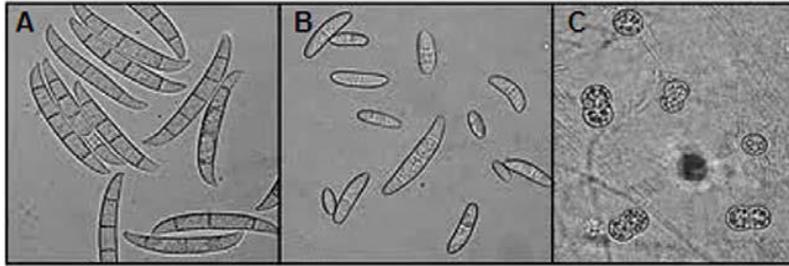


Figura 3. Tipos de esporas de *Fusarium*. (A) Macroconidios. (B) Microconidios. (C) Clamidosporas.

Los microconidios, con una o dos células, son los más abundantes y se producen con mayor frecuencia en cualquier circunstancia, presentando formas ovaladas y cilíndricas. Los macroconidios son las esporas típicas del género, aunque suelen ser menos abundantes. De aspecto fusiforme, están constituidas por un número de células que oscila entre tres y cinco, son septadas, puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las clamidosporas están compuestas por una o dos células, presentan una forma esférica y tienen la pared engrosada. Se originan por la modificación de un segmento de la hifa y su función, más que la propagación, es la supervivencia durante largos periodos de tiempo (Agrios, 2004).

F. oxysporum se propaga en distancias cortas, principalmente mediante irrigación con agua o por equipos contaminados, y puede extenderse en forma de esporas transportadas por el viento (Agrios, 2004) encontrándose prácticamente en todos los ecosistemas terrestres.

2.2. Ciclo de vida.

Como patógeno típico del suelo, *F. oxysporum* puede permanecer largos periodos en ausencia de la planta hospedadora, en forma de clamidospora o creciendo sobre restos de materia orgánica o exudados de raíces (estado saprofítico) (Beckman, 1987) (Figura 4).

Cuando el hongo percibe la proximidad de las raíces de la planta huésped, se produce la germinación de los microconidios, el crecimiento dirigido hasta llegar a ellas y la entrada en las raíces (estado parasítico). Una vez en el interior de una planta hospedadora, crece hasta alcanzar los vasos del xilema, colonizando posteriormente las partes más altas y provocando la marchitez vascular (estado patogénico) (Figura 4).

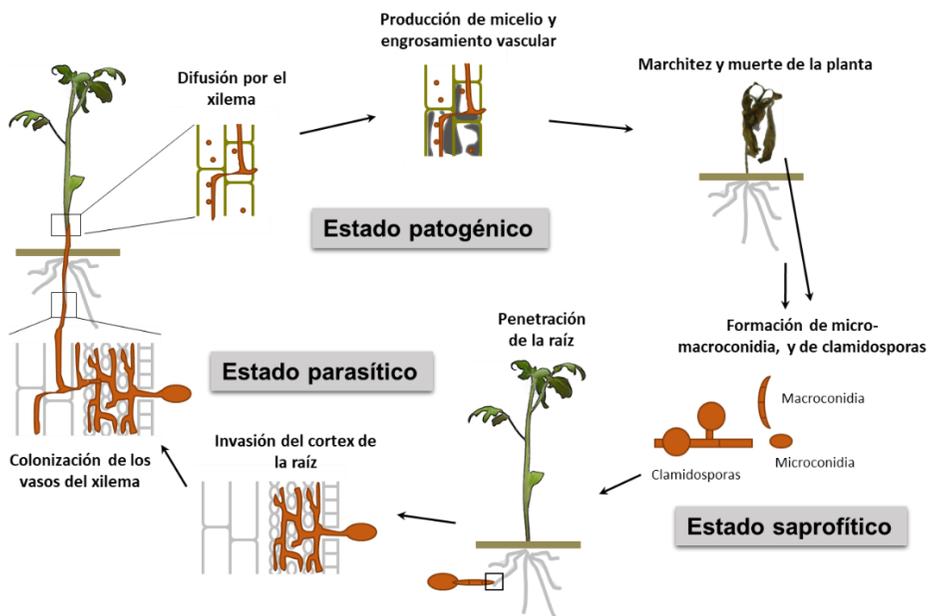


Figura 4. Ciclo de vida de *Furarium oxysporum*.

En el suelo, *F. oxysporum* es capaz de detectar la presencia de una planta hospedadora incluso antes de establecer contacto físico. Esto se debe a que los exudados de las raíces activan rutas de transducción de señales del hongo, respondiendo éste mediante la expresión de genes que regulan el desarrollo y la virulencia.

Tras la adhesión de las hifas a la superficie de la raíz (Figura 5A), se forma una densa red de que parece ser necesaria para iniciar la penetración (Czymbek *et al*, 2007; Olivain & Alabouvette, 1999; Rodriguez-Galvez & Mendgen, 1995). Estudios de microscopía electrónica han demostrado la ausencia de apresorios o

hifas especializadas para la penetración en *F. oxysporum* (Olivain & Alabouvette, 1999), así como la formación de un septo en el lugar de penetración de las hifas, que suelen utilizar aberturas intercelulares o heridas en las células epidérmicas (Pareja Jaime, *et al* 2010; Perez-Nadales & Di Pietro, 2011).

El sistema de defensa de la planta reacciona frente a los patógenos mediante dos tipos de respuestas: estructurales, formando barreras físicas que limitan la entrada e invasión del patógeno, y bioquímicas, mediante la producción de sustancias tóxicas para el patógeno que inhiben o limitan su crecimiento y proliferación en la planta. Por su parte, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil en el interior de la planta, poniendo en marcha una maquinaria de ataque, por ejemplo, a través de la secreción de enzimas líticas que degradan la pared celular vegetal (poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas) (Di Pietro *et al*, 2009).

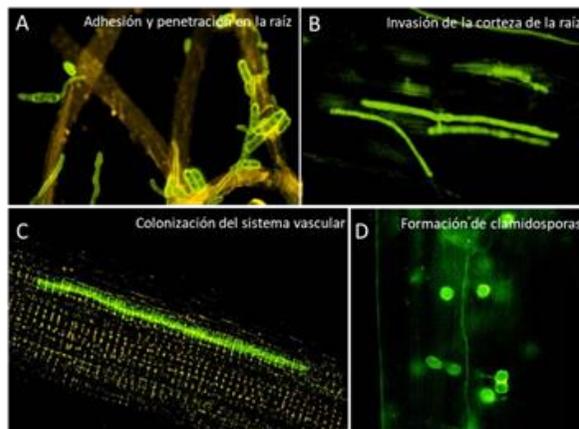


Figura 5. Estadios de la infección de *Fusarium oxysporum*. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* expresando la proteína verde fluorescente (GFP), infectando plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). (A) Germinación de microconidios y adhesión de hifas a la superficie de la raíz 1 día después de la inoculación (dpi). (B) Crecimiento de las hifas del hongo invadiendo el cortex de la raíz (5 dpi). (C) Hifa creciendo en el interior de los vasos de xilema (7 dpi). (D) Clamidosporas producidas en el tejido muerto de la planta (Di Pietro *et al*, 2001).

Una vez superadas las barreras defensivas de la planta, el hongo invade la corteza radical creciendo por los espacios inter e intra-celulares y alcanzando los vasos del xilema (Figura 5B), lo que le permite colonizar el tallo y las partes aéreas de la planta (Figura 3C). A medida que crece, el micelio se ramifica y produce microconidios, los cuales pueden subir por los vasos gracias a la corriente xilemática (Agrios, 2004). Posteriormente, el hongo coloniza la planta marchita y crece vigorosamente como saprófito, produciendo gran cantidad de clamidosporas (Figura 5D) que caerán al suelo donde permanecerán hasta la aparición de un nuevo hospedador (Beckman, 1987).

En este contexto surge el concepto de interacción planta-patógeno, donde la evolución adaptativa de ambos organismos ha tenido un papel fundamental. Las plantas evolucionan adquiriendo nuevas resistencias, mientras que los patógenos se adaptan desarrollando nuevos mecanismos que les permitan superarlas.

2.3. Interacción planta-patógeno.

La interacción planta-patógeno es un proceso complejo con varios estadios en los que actúan mecanismos de reconocimiento a distintos niveles. La combinación de todos ellos determinará el éxito o el fracaso de la infección (Jones & Dangl, 2006; Viswanathan, *et al* 2019). La capacidad de infección del patógeno se debe a los cambios adaptativos dentro de esta interacción a lo largo del tiempo, un proceso conocido como co-evolución.

Desde la detección de la proximidad de la planta, hasta la puesta en marcha de la maquinaria de ataque, el patógeno debe adaptarse a las distintas condiciones ambientales de cada momento. Por ejemplo, la secreción de metabolitos secundarios tóxicos por parte de muchos hongos es un mecanismo empleado con el objetivo de facilitar la colonización del hospedador. Un claro ejemplo es el ácido fusárico (FA), la primera fitotoxina fúngica aislada a partir de

plantas infectadas (Gäumann, 1957; Niehaus, *et al* 2014; Stipanovic, *et al* 2011). Por su parte, la planta puede reconocer la presencia del patógeno y desarrollar una respuesta defensiva para detener la incursión del organismo invasor.

En general, las especies vegetales no son colonizadas por la mayoría de los microorganismos patógenos, por lo que se las puede considerar resistentes a los mismos; ésta es la llamada resistencia general. Los patógenos vegetales producen diversas moléculas que pueden ser detectadas por la planta, como es el caso de algunos polisacáridos o glicoproteínas de la pared fúngica que advierten a la planta de la presencia del patógeno. Por otro lado, el patógeno puede desarrollar mecanismos para evitar ser reconocido como un agente extraño por parte de la planta como la secreción de toxinas y/o compuestos análogos a hormonas vegetales, como las fitotoxinas, que alteran la fisiología de la planta en su propio beneficio (Agrios, 2004). Esto convertiría la planta en hospedadora para ese patógeno en particular, dando lugar a una interacción compatible.

En *F. oxysporum* la compatibilidad básica se establece a nivel de razas fisiológicas que pueden ser avirulentas o virulentas en determinados cultivares de la planta, por lo que estos serán bien resistentes o sensibles. El concepto de virulencia se refiere al hecho de que una determinada raza fisiológica pueda provocar distintos grados de enfermedad en determinados cultivares.

2.4. Especialización adaptativa.

Otro aspecto a tener en cuenta es el grado de especialización del patógeno a la planta huésped que coloniza. En 1940, Snyder y Hansen definieron el concepto de la *forma specialis* (f. sp), para clasificar los aislados de *F. oxysporum* con capacidad de infectar una determinada especie, género o grupo vegetal. Aunque algunas ff. spp. infectan a un único hospedador, para otras el rango es más amplio y actúan sobre un grupo restringido de especies vegetales (Burnett, 1984). De gran interés agronómico son, por ejemplo, las del garbanzo (f. sp.

ciceris), la palmera datilera (f. sp. *albedinis*), la platanera (f. sp. *cubense*), el melón (f. sp. *melonis*), o la f. sp. objeto de este trabajo, que infecta el tomate (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol).

La enorme variabilidad existente dentro de *F. oxysporum* se ha tratado de estudiar en numerosas ocasiones desde el punto de vista de las relaciones filogenéticas. Estos estudios incluyen la evaluación de las distancias genéticas a través del análisis de patogenicidad, de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs), de las características cromosómicas y de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción en ADNr, ADNmt y otros marcadores moleculares (Jacobson & Gordon, 1990; Appel & Gordon, 1996; O'Donnell, *et al* 1998; Alves-Santos, *et al* 1999). Un resultado sorprendente del análisis de las relaciones filogenéticas entre aislados fue que la capacidad para infectar una determinada especie vegetal parece haber surgido independientemente a lo largo de la evolución, a partir de varios ancestros (Baayen, *et al* 2000; O'Donnell, *et al* 1998).

Más recientemente, la especialización patotípica de los aislados de *F. oxysporum* se ha relacionado con la presencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en el genoma de determinadas estirpes. Un ejemplo es la cepa Fol 4287, donde el cromosoma 14 es el más estudiado por su posible relación con la capacidad de infectar tomate (Ma & Van der Does *et al*, 2010).

2.5. Análisis genómico de Fol 4287.

El análisis de genómica comparativa de la cepa utilizada en el presente estudio, Fol 4287, en paralelo con otras dos especies de *Fusarium*, *F. graminearum* (Fg) y *F. verticillioides* (Fv), reveló que el genoma de Fol, donde se identificaron 15 cromosomas, es aproximadamente un 44% más grande (60 megabases), que el de Fv, con 11 cromosomas (42 Mb), y un 65% más grande que el de Fg, con 4 cromosomas (36 Mb) (Ma & Van der Does, *et al* 2010). El número tan inferior de cromosomas de Fg en comparación con Fv y Fol es el resultado de la fusión

cromosómica. La comparación global entre los tres genomas de *Fusarium* reveló que el incremento de material genético en Fol se debe a la presencia de secuencias únicas, llamadas regiones accesorias, que residen principalmente en cromosomas adicionales, llamadas específicas de linaje (LS), y que incluyen los cromosomas 3, 6, 14 y 15 y en una parte de 1 y 2 (Figura 7).

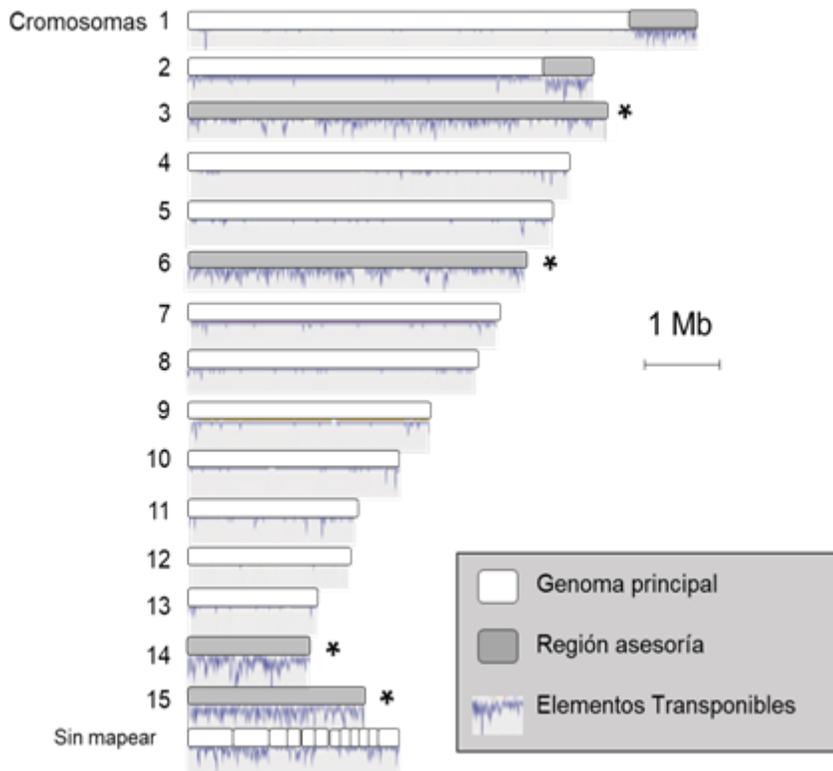


Figura 6. Vista global de la sintenia entre *F. oxysporum* y *F. verticillioides* junto con la distribución de elementos transponibles. Los cromosomas en color blanco representan los identificados como genoma conservado (core genome) por su alta homología con *F. verticillioides*. Los cromosomas en color gris corresponden a las regiones accesorias (LS) exclusivas del genoma de Fol (chr 3, chr 6, chr 14 y chr 15) (Ma & Van der Does *et al*, 2010).

Las características de las secuencias que se encuentran en las regiones LS indican un origen evolutivo distinto al resto del genoma. Se han propuesto tres posibles explicaciones: 1) Las regiones LS estaban presentes en el último ancestro común de las cuatro especies de *Fusarium*, pero luego se perdieron de forma selectiva e independiente en los linajes Fv, Fg y Fs durante la transmisión vertical;

2) Las regiones LS surgieron del genoma conservado por duplicación, seguido por divergencia dentro del linaje Fol; y 3) las regiones LS se adquirieron lateralmente por transferencia horizontal.

Para distinguir entre las tres hipótesis, se compararon las secuencias de los genes situados en las regiones LS con las de los genes en las regiones conservadas. Los resultados indicaron que el 90% de los genes de Fol localizados en el genoma conservado tienen homólogos en Fv y Fg, mientras que aproximadamente el 50% de los genes localizados en las regiones LS carecen de homólogos en Fv o Fg. Este resultado indica que la historia filogenética de las regiones LS difiere de la del genoma conservado, sugiriendo que la adquisición por transferencia horizontal es la más probable de las tres hipótesis.

Una de las funciones postuladas para los cromosomas LS es su relación con la patogenicidad y la especialización de las diferentes *ff. spp. de F. oxysporum*. Destaca además el gran número de transposones que albergan estas regiones, hecho que podría estar relacionado con su origen distinto y con la mayor inestabilidad cromosómica, fuente quizás de una mayor variabilidad genética.

3. Mecanismos genéticos asociados a la evolución de Fol.

A pesar de tratarse de un hongo sin reproducción sexual conocida, *F. oxysporum* posee mecanismos de variación del genoma que le permiten evolucionar y adaptarse a un entorno en constante cambio. Las variaciones observadas se han atribuido a la fusión de hifas y la formación de heterocariontes (Teunissen, *et al* 2002), las mutaciones puntuales (SNPs), o la actividad de elementos genéticos móviles o transposones (Daboussi & Capy, 2003). El primer mecanismo hace referencia a un fenómeno que se produce tras la anastomosis, o fusión de hifas, entre dos individuos en el que se observa la formación de un micelio con dos tipos núcleos o heterocarionte (Roca, *et al* 2005). Se trata de un

proceso muy regulado que se observa con relativa frecuencia en algunos ascomicetos y que podría ser el origen de las transferencias horizontales de cromosomas (Rep & Kistler, 2010; Mehrabi, *et al* 2011). La fusión es viable solo si los dos individuos tienen el mismo genotipo HET (incompatibilidad vegetativa del heterokaryon). De lo contrario se desencadena una reacción de muerte celular característica, llamada reacción de incompatibilidad, debido a que el heteroallelismo no puede ser tolerado en un heterocarión (Saupe & Glass, 1997). Por otro lado, las mutaciones puntuales pueden ser consideradas como un fenómeno aleatorio producido por errores de replicación de la ADN polimerasa, cuyas consecuencias pueden variar dependiendo de la región donde se produzca el error. Los SNPs son sinónimos cuando no alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida, o no sinónimos cuando la secuencia de la proteína traducida resulta modificada. Las mutaciones no siempre se producen en una región codificante, sino que se pueden encontrar en espacios intergénicos donde pudiendo o no afectar la expresión de un determinado gen (Lang, *et al* 2013). Finalmente, los elementos genéticos móviles tienen la capacidad de moverse desde una posición a otra aleatoriamente, o incluso de replicarse dentro del genoma.

A priori, la utilización del mecanismo de transposición como modo de generar variabilidad genética en un organismo haploide que carece de ciclo sexual encierra cierto riesgo. En el caso concreto de la cepa utilizada en este trabajo, se ha descrito la presencia de una variedad de elementos móviles en una proporción elevada, particularmente dentro de las regiones LS (Ma & Van der Does, *et al* 2010), por lo que parece razonable dedicarles especial atención.

3.1. Elementos transponibles.

Los elementos transponibles (TEs) son secuencias de ADN capaces de moverse de una ubicación a otra dentro del genoma. Han sido encontrados en

casi todos los organismos, tanto procariotas como eucariotas, por lo general en números elevados. Así, los TEs comprenden aproximadamente el 10% del genoma de varias especies de peces, el 12% en *C. elegans* (Stein, *et al* 2003), el 37% en ratón (Waterston, *et al* 2002), el 45% en humano (Lander, *et al* 2001) y más del 80% en algunas plantas como el maíz (San Miguel, *et al* 1996). Desde las bacterias hasta los humanos, los TEs se han ido acumulando a lo largo de la evolución y continúan modelando los genomas a través de su movimiento. Como los TEs constituyen un elevado porcentaje del genoma, se ha planteado la hipótesis de su participación activa en el incremento progresivo en su tamaño a lo largo de la evolución (San Miguel, *et al* 1998; Sheen & Levis, 1994; Locke, *et al* 2003). Actualmente se desconocen los desencadenantes del aumento del tamaño del genoma por TEs, aunque se cree que los distintos tipos de estrés podrían estar implicados en la amplificación de los TEs (Kalendar, *et al* 2000).

Como consecuencia del proceso de transposición, los TEs pueden producir diversos tipos de modificaciones genéticas en el sitio de integración: inserciones, escisiones, duplicaciones o translocaciones. Por ejemplo, los transposones de ADN pueden inactivar o alterar la expresión de genes mediante inserción dentro de exones, intrones o regiones reguladoras (Jordan, *et al* 1968; Rubin, *et al* 1982; Kazazian, *et al* 1988; Lerman & Feder, 2005; Clegg & Durbin, 2003). Una de las maneras más comunes de generar variabilidad reside en la propia estructura del transposón, que suele contener repeticiones directas de flanco. Estas repeticiones no forman en realidad parte del TE, pero juegan un papel importante en el proceso de inserción y el reconocimiento del sitio de destino, pudiendo además dejar huellas en la secuencia de origen. Asimismo, los TEs pueden participar en la reorganización del genoma mediante la movilización de ADN no transponible (Moran, *et al* 1999; Sayah, *et al* 2004; Prak & Kazazian, 2000) o actuando en procesos de recombinación. La recombinación se produciría por homología entre dos secuencias de un transposón localizadas en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes, lo que podría ser el origen de varios

tipos de alteraciones (Kidwell & Lisch, 2001). De hecho, los TEs pueden participar en la pérdida de ADN genómico por deleciones internas (Petrov & Hartl, 1997) u otros mecanismos (Gilbert, *et al* 2002; Symer, *et al* 2001).

La movilización de los TEs se denomina transposición o retrotransposición, dependiendo de la naturaleza de la secuencia intermedia utilizada para la movilización. Según este criterio, la clasificación más utilizada en la actualidad divide a los transposones en dos clases; Los de Clase I, o retrotransposones, son aquellos que requieren de una transcripción inversa a partir de un estado intermedio de ARN a ADN; y los de Clase II, o transposones de ADN, que no utilizan intermediarios de ARN.

Los retrotransposones de Clase I producen transcritos de ARN y luego utilizan la enzima transcriptasa inversa (RT) para retrotranscribir la secuencia de ARN nuevamente a ADN, que posteriormente se inserta en el sitio diana. Existen dos tipos principales de TEs de Clase I: retrotransposones LTR, que se caracterizan por la presencia de repeticiones terminales largas (LTRs) en ambos extremos; y TEs de tipo no-LTR, que carecen de estas repeticiones (Kazazian, 2004; Pray, 2008).

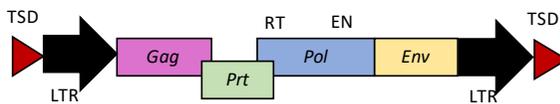
Los retrotransposones y retrovirus LTR son bastante similares en estructura (Figura 7). Ambos contienen genes *gag* y *pol* que codifican una envoltura característica de partículas virales (GAG); y una transcriptasa inversa (RT), ribonucleasa H (RH) e integrasa (IN) para proporcionar las actividades enzimáticas necesarias para generar ADNc a partir de ARN e insertarlo en el genoma. La diferencia está en que los retrovirus codifican una proteína de la envoltura que permite su movimiento de una célula a otra, mientras que los retrotransposones LTR carecen de ella, o contienen un remanente de un gen *env* y solo pueden reinsertarse en el genoma del que provienen (Kazazian, 2004).

A diferencia de los LTR, la transcripción inversa de los retrotransposones de tipo no LTR se produce por un mecanismo distinto. Se trata de elementos de

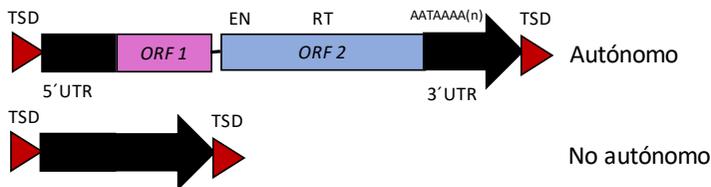
una longitud de 4 a 6 kb que generalmente tienen dos marcos abiertos de lectura (ORF), uno que codifica una proteína de unión a ácidos nucleicos y otro que codifica una endonucleasa y una RT (Figura 7). Debido a que estos elementos codifican las actividades necesarias para su retrotransposición se denominan autónomos, aunque probablemente también requieran proteínas de la célula huésped para completar el proceso.

Clase I

- LTR retrotransposon



- No LTR retrotransposon



Clase II

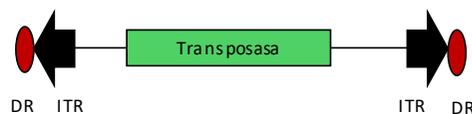


Figura 7. Clases de elementos móviles. Los retrotransposones autónomos comunes (Clase I) son del tipo LTR o no-LTR. Los elementos LTR tienen ORFs ligeramente superpuestas para los genes de antígeno (*gag*), proteasa (*prt*), polimerasa (*pol*) y envoltura (*env*) específicos del grupo. Producen duplicaciones en los sitios de destino (TSD) en el proceso de la inserción. También se muestran los dominios transcriptasa.

Los transposones de ADN o Clase II se caracterizan por la presencia, en su estructura, de un gen que codifica para la proteína transposasa. Esta proteína les permite moverse por sí solos, escindiéndose e insertándose por medio de un mecanismo llamado "corta y pega" (Pray, 2008). La transposasa reconoce unas

secuencias denominadas repeticiones terminales invertidas (ITR) en el ADN diana, tras lo cual realiza un corte para escindir el transposón de su lugar de origen, y una reacción de pegado para insertarlo en su sitio de destino. Debido a que las dos cadenas de ADN del sitio diana se cortan en puntos escalonados, el transposón tras la inserción queda flanqueado por pequeños huecos que, cuando se rellenan por la acción de enzimas de reparación, producen una secuencia duplicada corta (DR) característica del tipo de transposón (Craig, *et al* 2002).

Tanto los TEs de Clase I como los de Clase II pueden ser autónomos o no autónomos. Los TEs autónomos pueden moverse por sí mismos, mientras que los no autónomos requieren de la presencia de otros TEs para poder moverse. Esto se debe a que los elementos no autónomos carecen del gen de la transcriptasa inversa (Clase I) o de la transposasa (Clase II) que necesitan para su transposición, por lo que deben "tomar prestadas" estas proteínas de otro elemento para poder moverse.

3.2. Elementos transponibles en Fol 4287.

La distribución de los TEs dentro del genoma de Fol 4287 no es homogénea. La mayoría, en torno al 74%, se encuentran localizados en las regiones accesorias (LS). Alguno de estos cromosomas LS pueden ser transferidos horizontalmente entre cepas, y con ellos la capacidad de infectar una determinada especie de planta (Ma & Van der Does, *et al* 2010). El estudio de los TEs dentro del cromosoma patogénico 14 ha permitido observar que los TEs de Clase I y II están presentes en proporciones parecidas, 266 de Clase I y 249 de Clase II, (Tabla 1) (Schmidt, *et al* 2013). Este resultado resulta bastante sorprendente, ya que los retrotransposones a menudo dominan la fracción dentro de los TEs gracias a su mecanismo de replicación, el cual implica generar copias nuevas en cada ciclo de transposición (Rouxel, *et al* 2011; Spanu, *et al* 2010; Walbot, 2008; Wessler, 2006).

Dentro de la Clase I, y pertenecientes al orden LTR, se han identificado en *F. oxysporum* las superfamilias Gypsy/Ty3 (Ramos, *et al* 2007), Copia/Ty1 (De Jonge, 2012) y Yaret2 (Ma *et al*, 2004). Dentro de los retrotransposones del orden LINE, pero que carecen de secuencias LTR, se encontraron, por un lado, 31 elementos similares a MGR583 y 37 elementos similares a Yaret1 y Yaret1-like (25 y 12, respectivamente; Tabla1). Sin embargo, para el orden sin elementos LTR (SINE) se encontró únicamente el elemento Foxy, abundante- y uniformemente distribuido dentro de los cromosomas LS y los cromosomas conservados (Ma & Van der Does, *et al* 2010, Teunissen, *et al* 2003).

En comparación con los TEs de la Clase I, los de la Clase II se distribuyen de manera menos uniforme a lo largo de los cromosomas, formando muchos agregados. Estos TEs se insertan preferentemente en el mismo sitio o en sitios muy próximos, creando grandes subregiones cromosómicas enriquecidas en TEs. Los elementos de Clase II se dividen en dos subclases. En la subclase I se encontró una copia de Crypton. Los Criptonos codifican para una tirosina-recombinasa que les permite cortar y volver a unir cadenas de ADN recombinantes. Se identificaron por primera vez en hongos patógenos de humanos y luego se descubrieron también en vertebrados (Goodwin, *et al* 2003, Kojima & Jurka, 2011).

Dentro de los TEs de Clase II, el orden más abundante es el de los elementos con repeticiones terminales invertidas (TIR). En la superfamilia TC1/mariner, encontramos múltiples linajes del elemento Fot, pertenecientes a la familia pogo. La mayoría de TEs, incluidos Folyt (3 copias) y Hornet (16 copias), pertenecen a la familia hAT. Folyt se ha identificado como un TE activo en *Fol* (Gomez-Gomez, *et al* 1999), mientras que Hornet1 fue descubierto durante un análisis de transposones en *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Hua-Van, *et al* 2000) y se confirmó su actividad y papel en el cambio del patrón de virulencia (Takeshi, *et al* 2016; Keigo, *et al* 2012).

Además, en este análisis se han identificado 9 copias de un elemento Helitron. Los Helitrones son TEs poco usuales dentro de la Clase II ya que en lugar de utilizar el sistema de "cortar y pegar", se transponen a través de un mecanismo denominado de círculo rodante, con un solo corte de filamento que no generan zona TSD (Wicker, *et al* 2007), el cual a menudo captura genes del huésped contribuyendo a la evolución del genoma (Feschotte, *et al* 2007).

Tabla 1 Clasificación de transposones encontrados en el cromosoma patogénico 14 de la cepa Fol 4287. Modificado de Schmidt et al, 2013

Clasificación		Designación		Nº
Orden	Superfamilia	Familia	Nº	
Clase I (retrotransposon)				237
LTR	Gypsy/Ty3	24	MAGGY-like retrotransposon (3 tipos)	16
			Skippy	8
	Copia/Ty1	55	NHT2-like retrotransposon (5 tipos)	51
			Pcetro3-like retrotransposon	4
	Sin clasificar	20	Yaret2	20
	solo-LTR	28	Yaret2 solo-LTR	12
			Gollum (NHT2-like retrotransposon tipo	16
LINE		68	MGR583-like LINE element	31
			Yaret1	25
			Yaret1-like	12
SINE		32	Foxy	32
Sin-		10	Marsu	10
Class II (DNA transposons) - Subclass 1				208
Crypton		1	FoCrypton	1
TIR	Tc1/mariner	Pogo	41	Fot2
				2
			Fot 3	7
			Fot 4	1
			Fot 5	23
			Fot 6	6
			Fot 8	2
		Tc1	3	Impala
				3

Clasificación		Designación		Nº	
Orden	Superfamilia	Familia	Nº		
		hAT	70	Folyt1	3
				Folyt2	1
				Frodo	5
				Hornet	16
				Drifter	1
				NhORF4-like	2
				Sam	1
				YahAT1	6
				YahAT2	9
				YahAT3	3
				YahAT4	2
				YahAT5	4
				YahAT6	7
				YahAT7	10
		Mutator	20	Hop	1
				Hop3	6
				Hop4	5
				Hop5	2
				Hop6	6
		MITE	73	mimp (unclassified)	2
				mimp1	24
				mimp2	7
				mimp3	6
				mimp4	17
				mFot5	14
				Gimli	3
Class II (DNA transposons) - Subclass 2					
			9	Helitron	9
Class II (DNA transposons) – sin clasificar					
			40		40
Número total de TE					494

Conocer los cambios que se producen en los genomas, ya sean mutaciones puntuales (SNPs), movimientos de transposones o incluso reorganizaciones cromosómicas, requiere de la tecnología apropiada que permita detectarlos. Desde el primer método de secuenciación llamado Sanger (Sanger, *et al* 1977), a los métodos de segunda y tercera generación (NGS) actuales, se ha producido una auténtica revolución tanto en el volumen de datos generados, como en la metodología empleada y los resultados obtenidos.

4. Métodos de secuenciación.

La secuenciación de Sanger produce secuencias de ADN de alta calidad relativamente largas (500-1000 pb) y ha permitido el análisis de regiones concretas de interés. Sin embargo, la introducción de la tecnología de pirosecuenciación por 454 de Life Sciences en 2005 permitió incrementar el rendimiento a través de la ejecución de millones de lecturas (NGS) (Margulies, *et al* 2005) cuyo tamaño puede ser corto (50 - 400 pb) o más largo (1 - 100 kb) (Besser, *et al* 2018).

Las tecnologías de lectura corta actualmente en uso se conocen colectivamente como secuenciación de segunda generación (Schadt, *et al* 2010). Producen miles de millones de secuencias de nucleótidos durante cada ejecución y cada genoma se secuencia varias veces en pequeñas piezas aleatorias para generar conjuntos de datos muy grandes. Aunque las plataformas tienen diferentes metodologías bioquímicas y matrices, los flujos de trabajo incluyen pasos similares: 1) extracción de ADN; 2) preparación de la biblioteca, que generalmente incluye la fragmentación del ADN, ya sea de forma mecánica o enzimática, agregando adaptadores y códigos de barras/índices y amplificación; 3) preparación de la plantilla mediante amplificación en puente o PCR en emulsión; 4) secuenciación automatizada (Vincent, *et al* 2017).

Las distintas plataformas de secuenciación de lectura corta difieren sustancialmente en términos de ingeniería, química de secuenciación, producción (longitud de lecturas, número de secuencias), precisión y costo (Buermans & den Dunnen, 2014). La plataforma de Illumina, que actualmente engloba una gran parte del mercado de NGS, se basa en la secuenciación a través de la síntesis de la cadena complementaria y la detección mediante fluorescencia de nucleótidos terminadores bloqueados de manera reversible (Bentley, *et al* 2008). Actualmente, dentro de esta plataforma existen distintos instrumentos

como MiniSeq y MiSeq que ofrecen rendimientos bajos a precios moderados, y NextSeq, HiSeq y NovaSeq con mayor rendimiento y calidad.

La otra plataforma de secuenciación NGS es IonTorrent de Thermo Fisher. Su funcionamiento se basa en el mismo principio que Illumina, pero la detección utiliza medidores de pH en estado sólido que censan los iones de hidrógeno liberados durante la polimerización del ADN (Rothberg, J & Myers, 2011). En comparación con la plataforma de Illumina, el proceso de preparación de la biblioteca es más largo y su tasa de error es mayor.

Dado que las lecturas cortas de las plataformas de secuenciación de segunda generación tienden a generar ensamblajes genómicos relativamente fragmentados, la incorporación de nuevos sistemas que puedan generar lecturas más largas ha sido el objetivo de las nuevas plataformas, denominadas de tercera generación (Schadt *et al*, 2010). Estas tecnologías se aplican directamente a moléculas de ADN individuales sin necesidad de amplificación por PCR. La plataforma PacBio RSII, comercializada por Pacific Biosciences, utiliza tecnología de secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT) (Rhoads & Au, 2015). Al igual que con las tecnologías de lectura corta, la secuenciación se basa en la síntesis utilizando nucleótidos etiquetados con distintos marcadores fluorescentes, pero la secuenciación se produce cuando se depositan moléculas de ADN monocatenario en pocillos pequeños donde se inmoviliza una única molécula de ADN polimerasa. Se pueden obtener fragmentos de ADN más largos (≈ 20 kb), aunque tiene una tasa de error más alta que las tecnologías de lectura corta (11-15%), lo que requiere de un algoritmo de ensamblaje posterior que se basa en la corrección de errores (Chin, *et al* 2013). Finalmente, la última incorporación a los sistemas de tercera generación llegó con el dispositivo Nanopore (Pacific Biosciences), desarrollado por Oxford, que permite la obtención de lecturas largas a través de la identificación de las bases por cambios en la conductividad eléctrica generada cuando las cadenas de ADN pasan a través

de un poro. Se trata del dispositivo de secuenciación disponible más pequeño, pero su tasa de error es aún más elevada que en el sistema PacBio RSII (12–38%), aunque ha sido mejorado con los recientes avances en química (Lu, *et al* 2016). Al igual que en PacBio, deben emplearse complejos algoritmos de ensamblaje y corrección de errores para producir resultados de alta calidad (Lu, *et al* 2016; Loman, *et al* 2015)

Para poder relacionar los posibles cambios fenotípicos con las mutaciones génicas en un ensayo de evolución experimental, se hace imprescindible la utilización de herramientas bioinformáticas apropiadas que permitan el análisis y la gestión de los enormes archivos generados en la secuenciación de manera ordenada y eficiente. Dado que el análisis de datos no sigue un modelo único y la combinación de distintas herramientas de software pueden dar lugar a resultados variables, es necesario el desarrollo de una "*pipeline*" de análisis eficiente y precisa para la correcta identificación y caracterización de las posibles variantes presentes en cada muestra con respecto al genoma de referencia.

5. Objetivos.

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Creación de líneas independientes evolucionadas a partir del mismo linaje clónico de origen de Fol 4287, a través de 10 pasajes en tres condiciones experimentales distintas: 1) infección de plantas de tomate; 2) crecimiento y esporulación en placas de medio completo (YPGA); y 3) crecimiento y esporulación en placas de medio mínimo (MM).
2. Secuenciación, mediante tecnologías de nueva generación (NGS), del genoma de las poblaciones generadas tras los 10 pasajes.
3. Identificación y análisis de los cambios genéticos mediante comparación de secuencias entre las distintas líneas evolucionadas y la cepa original.
4. Seguimiento de la dinámica evolutiva poblacional de algunos de los eventos encontrados, a través de diversas técnicas moleculares.
5. Aislamiento de cultivos monospóricos, genéticamente homogéneos, a partir de cada una de las poblaciones evolucionadas.
6. Estudio de los cambios fenotípicos producidos, tanto a nivel poblacional como a nivel de los aislados monospóricos, en comparación con la cepa original.
7. Relevancia del metabolito secundario Acido fusárico en la virulencia de *F. oxysporum*.

Materialles y métodos

6. Material biológico y organismos utilizados

6.1. *Fusarium oxysporum*

Para la elaboración de esta tesis se ha utilizado la estirpe de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* registrada en el Fungal genetic Stock Center como la variedad 4287 obtenida originariamente de J.Tello (Universidad de Almería) y conservada como suspensión de microconidios a -80°C en glicerol al 30%. El stock utilizado para la realización de los todos los ensayos fue el mismo en previsión de posibles cambios inesperados o no controlados.

El patotipo de dicha cepa se confirma periódicamente mediante ensayos de infección en plantas de tomate.

Tabla 2. Cepas fúngicas utilizadas

Cepa	Genotipo	Fuente/ Referencia
Wt (Fo4287)	Silvestre, raza 2	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL54004	f. sp. <i>raphani</i>	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL54008 (PHW808)	f. sp. <i>conglutinans</i>	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL54003 (MN25)	f. sp. <i>lycopersici</i> (race 3)	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL54002 (Fo47)	Cepa de biocontrol	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL26381 (CL57)	f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL32931	Aislado humano	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL37622 (HDV247)	f. sp. <i>pisi</i>	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL54006 (II5)	f. sp. <i>cubense</i> (TR4)	Fusarium Genetic Stock Center
NRRL26406	f. sp. <i>melonis</i>	Fusarium Genetic Stock Center
699	f. sp. <i>conglutinans</i>	Fusarium Genetic Stock Center
$\Delta fgb1$	<i>fbp1::HYG</i>	Miguel-Rojas & Hera, 2013
$\Delta atg8$	GFP::atg8	(Corral-Ramos, <i>et al</i> 2015)
$\Delta fso1$	fso1::HYG	(Prados Rosales, <i>et al</i> 2008)
Δlae	Lae::HYG	(López-Berges, <i>et al</i> 2012)
$\Delta NoxR$	<i>NoxR::HYG</i>	Nordzieke et al, sin publicar
$\Delta NoxA$	<i>NoxA::HYG</i>	Nordzieke et al, sin publicar
$\Delta NoxB$	<i>NoxB::HYG</i>	Nordzieke et al, sin publicar
$\Delta fbp1$	<i>fbp1::HYG</i>	Miguel-Rojas, sin publicar
$\Delta Ste12$	<i>ste12::HYG</i>	(Rispaill & Di Pietro, 2009)
$\Delta modA$	<i>modA::HYG</i>	Benocci et al, sin publicar
Δvea	<i>vea::HYG</i>	(López-Berges, <i>et al</i> 2012)
$\Delta bmh1$	<i>bmh1::HYG</i>	Miguel-Rojas

Cepa	Genotipo	Fuente/ Referencia
$\Delta fmk1$	<i>fmk1::PHLEO</i>	(Di Pietro et al., 2001)
$\Delta pacC$	<i>pacC\Delta::hph</i>	Caracuel Z et al., 2003
$\Delta pacC^C$		Caracuel Z et al., 2003
$\Delta fub1$	<i>fub1::hph</i>	López-Díaz C & Rahjoo V et al., 2018
$\Delta fub1^C$	<i>fub1\Delta::hph; fub1::phleo</i>	López-Díaz C & Rahjoo V et al., 2018
$\Delta velB$	<i>velB::HYG</i>	Este estudio
$\Delta 21009$	<i>21009::HYG</i>	Este estudio
velB C341T^c	<i>velBY10-4.4;velB::HYG</i>	Este estudio

6.2. Huésped vegetal

Para la realización del ensayo de evolución, así como para diversos ensayos fenotípicos sobre el huésped principal, se utilizaron plantas de tomate F1 (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Monika (Syngenta).

6.3. Huésped animal

Para la realización de diversos ensayos fenotípicos se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae: Polilla de cera) en el estadio larvario final de entre 0,1-0,3 g (Animal Center S. A., Valencia, España).

7. Vectores plasmídicos

Los vectores de clonación universal usados se detallan a continuación

Tabla 3. Vectores de clonación

Vector	Características	Fuente/Referencia
Plásmido pGEM[®]-T	Derivado del plásmido pGEM [®] -5Zf(+), linealizado con la enzima <i>EcoRV</i> y con una T añadida en cada uno de los extremos 3'	Promega
pAN7-1	pUC18; promotor del gen <i>gpdA</i> de <i>A.nidulans</i> ; gen de la higromicina B fosfotransferasa de <i>Streptomyces spp.</i> (<i>hph</i>); terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i>	(Punt et al., 1987)

8. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se esterizaron en autoclave (Selecta) a 1,2 atm y 120 °C durante 20 min o mediante filtración usando filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm. Los medios sólidos fueron repartidos en placas Petri antes de su solidificación.

8.1. Medios de cultivo para crecimiento de *E. coli*

El crecimiento bacteriano de *E. coli* se llevó a cabo en los siguientes medios:

-Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972).

Composición por L	
bactotripton	10 g
extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O MQ	1 L

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1 M.

El LB se suplementó con 15 g/L de bactoagar para medio sólido (LA) y ampicilina (100 µg/mL) para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a ese antibiótico. Para bacterias portadoras de plásmidos con selección por color (β-galactosidasa), el LA se suplementó con IPTG (25 µM) y X-gal (50 µg/mL).

8.2. Medios de cultivo para el crecimiento de *F. oxysporum*

El crecimiento de *F. oxysporum* se llevó a cabo en los siguientes medios:

-Potato Dextrose Broth (PDB):

Composición por L	
Patatas peladas y hervidas 1h	200 g
Glucosa	20 g
H ₂ O MQ	1 L

Transcurrido el tiempo de cocción, las patatas son trituradas y filtradas.

-Potato Dextrose Agar (PDA):

Composición por L	
Extracto de Patatas	20 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
H ₂ O MQ	1 L

Disolver 39 g de PDA (Scharlau Microbiolgy) en 1 L de agua MQ.

-Yeast extract Peptone Dextrose (YPD):

Composición por L	
Extracto de levadura	3 g
Peptona	10 g
Glucosa	20 g
H ₂ O MQ	1 L

Añadir 15 g/L de bactoagar para medio sólido.

-Medio Mínimo Puhalla (MMP, Puhalla, 1968):

Composición por L	
MgSO ₄ · 7 (H ₂ O)	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
NaNO ₃	2 g
Sacarosa	30 g
H ₂ O MQ	1 L

Añadir 15 g/L de agar oxoid para medio sólido.

-Medio Mínimo de Regeneración (MMR):

Composición por cada L	
MgSO ₄ · 7 (H ₂ O)	0,5g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
NaNO ₃	2 g
Glucosa	20 g
Sacarosa	200 g
H ₂ O MQ	1 L

8.3. Compuestos químicos

Para llevar a cabo Distintos ensayos de sensibilidad y fenotipicos se utilizaron los siguientes compuestos químicos preparados según la concentración necesaria en cada caso (Tabla 4).

Tabla 4. Soluciones empleadas en distintos ensayos fenotípicos

Compuesto	Ensayo	Preparación	[] utilizada
Blanco de calcofluor (CFW); Sigma NaCl; Sigma Menadiona	Estrés de pared	10 mg/mL (0,5%KOH+83%glicerol)	50 µg/mL
	Estrés salino		1,5 M
FeSO₄	Estrés oxidativo	20 mg/mL etanol	20 µg/mL
	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5 H ₂ O	50 µM
CuSO₄	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5	0,05-0,5-5 -10 mM
	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5	50 µM
FeSO₄	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5	0,05-0,5-5 -10 mM
	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5	50 µM
Ácido fusárico	Expresión A.F y Toxicidad	10mM, pH 6,5	0,05-0,5-5 -10 mM
	Toxicidad de ácido fusárico		0,25-0,5-0,75 mg/mL pH ajustado 5.5-6.

9. Crecimiento y cultivo de organismos

9.1. E. coli

E. coli se cultivó en medio líquido LB a 37 °C con agitación (250 rpm) o en medio sólido LA en estufa a la misma temperatura, con ampicilina para estirpes portadoras de plásmidos con el gen de resistencia.

La conservación prolongada de las distintas estirpes bacterianas se realizó a -80 °C en medio LB con 30 % glicerol (v/v). Para periodos cortos se mantuvieron en medio LA a 4 °C.

9.2. *F. oxysporum*

9.2.1. Crecimiento y recogida de microconídios

Para la obtención de microconidios frescos se cultivaron en PDB* durante 3-4 días las diferentes estirpes de *Fusarium*, a 28 °C y 170 rpm. La separación del micelio se realizó a través de un filtro de nylon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) permitiendo obtener los microconidios, que se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos para la eliminación del medio. Los microconidios se resuspendieron en agua estéril para su recuento en cámara de Thoma y uso en los distintos ensayos. Cuando fue necesario el micelio fue separado del monodur con ayuda de una espátula previamente flameada y conservado -80 °C.

(*) Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 µg/mL en PDB o 55 µg/mL en PDA).

9.3. Plantas de tomate

Para la obtención de plantas de tomate, las semillas se esterilizaron superficialmente en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 30 minutos, seguida de 2 lavados de 10 minutos con abundante agua. Una vez escurridas se sembraron cuidadosamente y de manera equidistante sobre una cama de vermiculita (4 µm) humedecida. Las plantas se desarrollaron durante aproximadamente 14 días, con el primer par de hojas verdaderas, en una cámara de crecimiento ajustada a 28±1 °C, con humedad relativa de 40-70 % y un fotoperiodo de 14:10 L:O de luz blanca fluorescente (360 µE·m⁻²·s⁻¹). Además, las plantas se regaron con agua de la red según sus necesidades hídricas sin aportaciones nutritivas externas.

10. Aislamiento de ácidos nucleicos

10.1. 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.

1. Se inoculó en 5 mL de medio selectivo LB una colonia aislada de la estirpe portadora del plásmido de interés.
2. Se incubó durante de 12-14 horas 37 °C y 250 rpm.
3. 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.
4. 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.
5. Seguidamente, la muestra se calentó a 100 °C durante 45 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm.
6. Para eliminar los restos celulares que quedan en el fondo del tubo con aspecto gelatinoso se utilizó un palillo de dientes estéril.
7. Se añadieron 10 µL de solución CTAB al sobrenadante para precipitar el ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. 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.

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

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

10.2. Extracción de ADN de *F. oxysporum*, método del CTAB

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó mediante el método de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con algunas modificaciones.

1. El micelio liofilizado durante 12 horas mediante un liofilizador Labconco (Kansas City, Missouri, EEUU) se molió añadiendo a cada tubo bolas de vidrio de 0,425-0,600 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y mediante el uso del homogeneizador Fast prep® (Bio 101 Systems, Qbiogene, Madrid, España).
2. A cada vial de 2 mL, se le añadió 1 ml de tampón de extracción CTAB, 4 µL de β-mercaptoetanol y cloroformo:octanol (24:1,v/v) hasta completar el volumen del tubo.
3. Antes de incubar a 65 °C durante 30 minutos se homogeneizó la mezcla con un vortex.
4. Posteriormente, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó 5 minutos a 7000 rpm.
5. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL.
6. Para precipitar el ADN, se añadieron 2,5 volúmenes de 100% etanol frío, mezclando por inversión y dejando incubar durante 60 minutos para extracción de micelio o 12-14 h para extracción de planta a -20°C.
7. Centrifugar a 13.400 rpm durante 10-15 minutos. En aquellos casos en los que la calidad del ADN debía ser excelente se recogió el ovillo de ADN generado con una varilla de vidrio.
8. Retirar el sobrenadante, añadir 1 mL de 70% etanol y centrifugar a 13.400 rpm durante 10 minutos.

9. Retirar de nuevo el sobrenadante, dejar secar el pellet y resuspender cada muestra en 60-100 μ L de agua MQ estéril.
10. Por último, se añadieron 4 μ L de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos.

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 con NaOH. Llevar a 100 mL y almacenar a 37 °C para evitar que precipite.

10.3. Extracción de ARN de *F. oxysporum*

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas para cada experimento.

1. Se pulverizaron con ayuda de un homogeneizador (Fast prep®) unos 20 mg de micelio en un vial de 2 mL.
2. A continuación, se añadió 1 mL de Tripure Isolation Reagent (Roche) y se homogeneizó vigorosamente usando un vortex.
3. Tras una centrifugación de 10 minutos a 4 °C y 13.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 4 °C durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
4. Se añadieron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente durante unos 15 segundos y se incubó a 4 °C durante 15 minutos.
5. Tras centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4 °C, la mezcla se separó en tres fases, de las cuales, la fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a otro tubo con 500 μ L de isopropanol.
6. Se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4 °C para recoger el ARN precipitado.
7. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de 75 % etanol (v/v).

8. Finalmente, se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y 10.000 rpm, se secó y se resuspendió en 50 µL de agua libre de ARNasas. Posteriormente se incubó a 55-60°C durante 10-15 minutos.
9. Por último, antes de conservar las muestras a -80 °C, se cuantificó el ARN mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad por visualización en gel de 0,7% agarosa (p/v).

11. Manipulación de ácidos nucleicos

11.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

11.1.1. PCR estándar

Las reacciones de amplificación convencionales se realizaron con la enzima termorresistente *Taq polimerasa BIOTAQ™* DNA polymerase (Bioline) en las condiciones de reacción especificadas por el fabricante y en un termociclador modelo T100™ Thermal Cycler (BioRad) (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de amplificación para PCR estándar

Reacción	Componente	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
PCR	Tampón de PCR	10X	5	1X
	MgCl ₂	50 mM	2,5	2,5 mM
	dNTPs	8 mM	5	0,8 mM
	Oligonucleotido F (5')	15 pmol	0,8	0,24 µM
	Oligonucleótido R (3')	15pmol	0,8	0,24 µM
	<i>Taq</i> Polimerasa	2,5 U/µL	0,8	0,4 U/µL
	H ₂ O			Vol final 50 µL
Amplificación	Desnaturalización inicial: 94 °C		3 min	
	Desnaturalización: 94 °C		0,35 min	} x 35 ciclos
	Hibridación: 62-64 °C		0,35 min	
	Extensión: 72-68 °C		1 min Kb	
	Extensión final: 72-68 °C		10 min	
Mantenimiento: 16 °C				

11.1.2. PCR con polimerasa de alta afinidad

Para las reacciones donde se requería una alta fidelidad en la amplificación se utilizó la enzima *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de amplificación para PCR

Reacción	Componente	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
PCR	Tampón de PCR	10X	5	1X
	MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
	dNTPs	8 mM	5	0,8 mM
	Oligonucleotido F (5')	15 pmol	0,8	0,24 μM
	Oligonucleótido R (3')	15 pmol	0,8	0,24 μM
	Oligonucleótido R (3')	2,5 U/μL	0,8	0,4 U/μL
	Taq Polimerasa		Vol final 50 μL	
	H ₂ O			
Amplificación	Desnaturalización inicial: 94 °C		3 min	
	Desnaturalización: 94 °C		0,35 min	} x 35 ciclos
	Hibridación: 62-64 °C		0,35 min	
	Extensión: 72-68 °C		1 min Kb	
	Extensión final: 72-68 °C		10 min	
	Mantenimiento: 16 °C			

11.1.3. PCR de marcaje

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

La purificación de la sonda se realizó mediante precipitación añadiendo 0,1 vol de una solución 8 M acetato de litio y 3 volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió

en 10 µl de agua desionizada. La calidad de la sonda se comprobó visualizándola en gel de 0,7% agarosa (p/v).

11.1.4. Construcción de mutantes nulos mediante Split-marker

La generación de mutantes nulos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se llevó cabo mediante reemplazamiento génico dirigido usando la técnica Split Marker (Catlett et al., 2003). Esta técnica es muy ventajosa ya que al forzar el mecanismo de recombinación reduce, en gran medida, los falsos positivos obtenidos por recombinación heteróloga.

Para ello, en cada transformación se utilizaron dos fragmentos de ADN, obtenidos a partir de dos rondas de PCR, con secuencias solapantes en el marcador de resistencia (Figura 9). En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias flanqueantes del gen a interrumpir mediante oligonucleótidos específicos (Tabla 8-12) y utilizando ADNg del hongo como molde. Los cebadores internos del gen a interrumpir deben llevar una cola complementaria, de al menos 25 nucleótidos, a los extremos del gen de resistencia, que permita la posterior hibridación de las secuencias en la segunda ronda de PCR. Por otro lado, se realizó otra PCR del gen marcador (higromicina B) a partir de un vector portador de dicho casete. En la segunda ronda de PCR se fusionó por un lado la secuencia promotora del gen diana al extremo 3' del casete de resistencia y por otro la secuencia terminadora del gen con la secuencia 5' del casete de resistencia. De este modo, cada construcción era portadora aproximadamente del 75 % de cada extremo del casete de resistencia, incluyendo una región idéntica en ambas construcciones (Carroll et al., 1994).

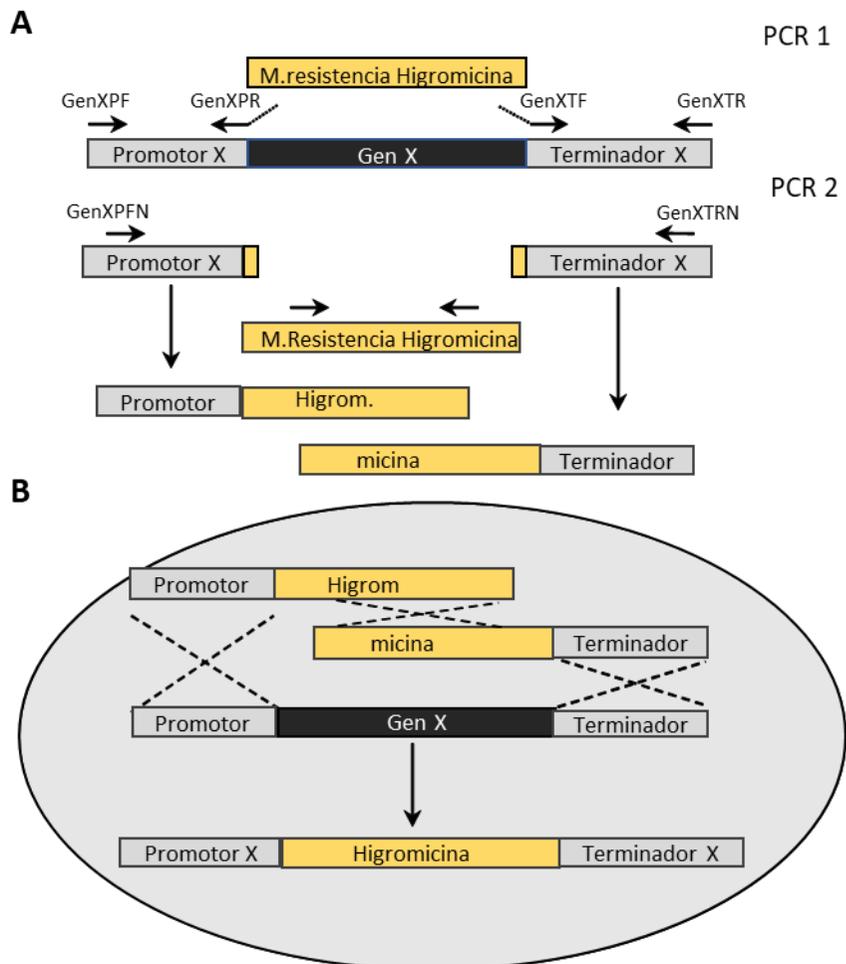


Figura 8. Esquema de interrupción génica mediante la técnica Split Marker (Catlett et al, 2003). (A) Obtención de construcciones; (B) Suceso de recombinación que se espera que ocurra en el interior del protoplasto de *F. oxysporum*

Para la obtención de mutantes con alelos delecionados se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum*, empleando las dos construcciones solapantes obtenidas anteriormente. La recombinación esperada debe ser mediante sustitución homóloga del gen diana por el casete de resistencia (Figura 9.B), es decir, las dos construcciones deben recombinar entre sí en el interior del hongo, obteniéndose una única construcción con el casete de resistencia completo y funcional, que a su vez deberá recombinar de manera

homóloga en el gen diana, sustituyendo el alelo silvestre por el casete de resistencia.

11.1.5. Transcripción inversa: Síntesis de ADN copia (ADNc)

En primer lugar, el ARN purificado se trató con ADNasa I (Fermentas) durante 30 minutos a 37 °C. Para detener la 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.

Para la síntesis de ADN copia, el ARN tratado con ADNasa I se sometió a una transcripción inversa con la retrotranscriptasa M-MLV ("Moloney Murine Leukemia Virus" Reverse Transcriptase) de Invitrogen. La reacción se llevó a cabo en un vial libre de nucleasas y para un volumen final de 40 µL.

Se mezclaron 2 µg de ARN total con 200 pmol de cebador oligo-dT y 0,8 mM de dNTPs; la mezcla se llevó hasta 18 µL con agua desionizada estéril y se incubó a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se introdujo en hielo rápidamente y se añadió 1X 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). Se incubó a 37 °C durante 2 minutos y, transcurrido ese tiempo, se añadió la retrotranscriptasa (10 U/µL), incubando la reacción a 37 °C durante 50 minutos más. Por último, para inactivar la enzima, se calentó a 70 °C durante 15 minutos.

11.1.6. PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado (3 repeticiones técnicas a partir de 3 réplicas biológicas). Se usaron placas de 96 pocillos (BioRad) en un equipo *iCycler iQ Real-time PCR System* (BioRad).

Para la medición de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real se añadió por cada reacción 5 µL de ADNc diluido en agua desionizada estéril (1:1) con alícuotas de una misma mezcla.

La cuantificación del número de copias en el genoma (CNVs) en los distintos casos se realizó a través de qPCR con 5 µL ADNg de calidad suficiente y diluido hasta 15ng/µL. Las condiciones de amplificación para ambos casos se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 7. Condiciones de amplificación de la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión génica

Reacción	Componente	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
PCR	iQ SYBR Green Supermix		7,5	1X
	Oligonucleotido F (5')	15 pmol	0,3	0,3 µM
	Oligonucleótido R (3')	15pmol	0,3	0,3 µM
	H ₂ O		Vol final 15 µL	
Amplificación	Desnaturalización inicial:	95 °C	10 min	
	Desnaturalización:	95 °C	0,10 min	} x 40 ciclos
	Hibridación:	62-64 °C	0,10 min	
	Extensión:	72 °C	0,20 min	
	Determinación de fluorescencia:			80°C

Para analizar los productos obtenidos tras las PCRs se realizaron las curvas de desnaturalización (*Curvas de Melting*). Para ello se programó el equipo para aumentar 0,5 °C cada 5 segundos, comenzando en 65 °C hasta alcanzar los 95 °C, donde se determinó la fluorescencia tras cada aumento de temperatura.

El cálculo de la eficiencia (E) de las reacciones de qPCR, se realizó mediante diluciones seriadas del ADNc que fueron empleadas como moldes en reacciones de amplificación. El valor E se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida tras representar el logaritmo en base 10 de la cantidad de ADNc utilizada para la amplificación frente al ciclo umbral (Ct) de amplificación, según la ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Los niveles de expresión relativa se calcularon siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), normalizando los datos frente al gen de referencia actina. Los valores de Ct obtenidos fueron considerados como válidos si la dispersión de los datos de cada triplicado era tal que su desviación típica fuera menor a 0,1.

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

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_p - Ct_c)_{Tto} - (Ct_p - Ct_c)_{Ref}$$

Donde:

- **Rp:** Expresión relativa del gen problema con respecto a la del gen control
- **P:** Gen problema
- **C:** Gen control
- **Ref:** Condiciones de referencia
- **Tto:** Condiciones de tratamiento

11.2. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación, secuenciación y extensión se diseñaron con el programa Oligo (versión 7.0; Molecular Biology Insights, Inc. USA), optimizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillas no deseadas, así como diversos parámetros físico químicos (T_m , $(2A+T)^\circ + 4(G+C)^\circ$). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial Isogen Life Science (Netherlands). Las secuencias terminales incluidas en los oligonucleótidos para permitir la hibridación con los extremos 3' o 5' del casete de resistencia a higromicina aparecen en minúscula.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para realización de mutantes y expresión.

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
VelB F 1	CTCCACAAATCATCCATCCTC	64 °	Mutante nulo
VelB R1	TATGACAAGACGAACACACGG	64 °	
VelBPF	AGACCGGATTGACAACGACCA	64 °	
VelBPFN	GGCTGAGACACAATGGTAAGG	64 °	
VelBPR	ttaccagaatgcacaggtacactgtttaGGTTAT CGAGAATTGGTGCCG	64 °	
VelBTF	tggtcgttaggggctgtattaggtctcCTGAATT TGGTCTGTGCCGTG	64 °	
VelBTR	ATGCTGTACTCGCTCCTCACT	64 °	
VelBTRN	GCGTAGGCACTGAAAGATGAG	64 °	
U9genP2	TTGCAGAGTTTGGGAGAGAGG	64 °	Mutante nulo
U9genPR2	ttaccagaatgcacaggtacactgtttTG TAGCT CTGGGCCGTGTATA	64 °	
U9genPN2	TCCGAAGCCGTCACATTCACT	64 °	
U9genTF2	tggtcgttaggggctgtattaggtctcATAGTGC CTGGTAGTGTCGAG	64 °	
U9gen TR	TTCAGGTTTAGGTGGTCTCGG	64 °	
U9gen TRN	GGCAACAAGCTAACTGGAGAG	64 °	
gpdA-15b	CGAGACCTAATACAGCCCCTA	62 °	PCR
tripter-8b	CCTGTGCATTCTGGGTAACG	62 °	PCR
act-q7	ATGTCACCACCTTCAACTCCA		qPCR
act-q8	CTCTCGTCTACTCCTGCTT		qPCR
fub1-F3	GGGTTT GAGTTGTGCTGAGG		qPCR
fub1-R3	AGAACGCTCATTATACTTGCTG		qPCR
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA		PCR
hyg-12	TTCGGGGCAGTCTCGGC		PCR
EFα1-1	TACTGGTGGTTTTGAAGCTGG		qPCR
EFα1-2	AACTTCCTTACGATTCATCA		qPCR
fub1-F4	GCAGTGGGTCATTCTCTCGG		qPCR
fub1-R4	TTTACATTACATACCGATTCA		qPCR

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para cuantificación de CNVs

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
T5Chr1F	GTATCTAAACCTGCGCTCCGA	64 °	qPCR delección
T5Chr1R	CAAGAGTAGCCAGGAACCAAC	64 °	qPCR delección
T6Ch1F	TGACGAGCTGACGATGCTAAC	64 °	qPCR delección
T6Chr1R	GCGTACTGGTAGCATAGAGG	64 °	qPCR delección
T1Chr3F	CCCATTCAAACTCGGACCAA	64 °	PCR
T1Chr3R	CAGGTGTTCAAAATGGCACTC	64 °	PCR
T1Chr3F-Q	CCAGCCTCTCAAAGATCGAC	64 °	qPCR delección
T5Chr3-6R	CCGTCCTTAGCCCTTATCGAA	64 °	qPCR duplicación
T5Chr3-6F	TCCTCATGTTCTGCTCCCAT	64 °	qPCR duplicación
T6Chr3-6F	CATCGTCAACCAAGCCAAGT	64 °	qPCR duplicación

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
T6Chr3-6R	GGTGGCTTGAGGATACACAAC	64°	qPCR duplicación
T1Chr6F	CTTGTGGTCGTTGTAGGGTTC	64°	PCR delección
T1Chr6R	CTCTGCGATTTGGCCTGATTG	64°	PCR delección
T2Chr6F	GTGGTGTGGAAGCGTGAAGT	64°	PCR delección
T2Chr6R	CTATGAGAGCTGGTGCGAATG	64°	PCR delección
T1Ch6F-Q	AAGCAGACCCTACGGCTATGA	64°	qPCR delección
T1Ch7F	CTTGGAActCTCAGCGATAGG	64°	PCR
T1Ch7R	CGGTGGTAGACATGACGGTTA	64°	PCR
T2Ch7F	TCAAGTACCCAACCTCCAAC	64°	PCR
T2Ch7R	CTTGAGGCTGGCTACTTTGAG	64°	PCR
T3Ch7F	TGTTCTTACCCTAGTCCGAC	64°	PCR/qPCR
T3Ch7R	GAGGGAGTTGGTATAGTGGTG	64°	PCR
T3Ch7R2	CAGCTCAGACGTTGATGCACA	64°	q-PCR
T2Ch9F	GACTGCAACGACAAGAAAGGC	64°	q-PCR
T2Ch9R	TCTTCAGGGTGGAGGTAAGCA	64°	q-PCR
T2Ch10F	CAAGCAAAAAGTTCTGGGG	64°	PCR
T2Ch10R	GGCTGGGTCTATCTTCGATTC	64°	PCR
T1Chr13F	GTGACTCTATACCTACTCCC	64°	qPCR
T1Chr13R	GTCAGTCAACGATGTCAGTGG	64°	qPCR
T2Chr13F	GGAATCTTGGCTGAAACGCTG	64°	qPCR
T2Chr13R	AGCGAAGCAAATCCAGCCCC	64°	qPCR
T3Chr13F	CTTCTTCTCGCTGGTCTGTCT	64°	qPCR
T3Chr13R	GACATGGAGGAGTACAAGGCT	64°	qPCR
T1Ch14F2	CGAGCTTGTGGATTTCTGGTG	64°	PCR
T1Ch14R	ACTAATGCCTACCCTGCGACA	64°	PCR
T2Ch14F	GGTCTTCGCTGTCTGCTTTT	64°	PCR
T2Ch14R	GACGAGGAACCATCATCACAG	64°	PCR
T3Ch14F	CCTCATCCGATAACCTCTTGG	64°	PCR/qPCR
T3Ch14R	GCAATGAGACAGACCCAAGCA	64°	PCR
T3Ch14R2	CGCAACGTCCTGTATGATCGA	64°	q-PCR
T3Chr15F	CTTGCTGGCGGATTTGTTGGA	64°	qPCR delección
T3Chr15R	GGCACGGTGAAGACAAAACAG	64°	qPCR delección
T4Chr15F	TTGGAGGAGAAGTGGAAACGG	64°	qPCR delección
T4Chr15R	CTGACTGACTCGTACTATCCG	64°	qPCR delección
T5chr15F	TCGCAATCTTCGGTCTCGAA	64°	qPCR delección
T5Chr15R	TGAAAGAACCCTGGACGTGGT	64°	qPCR delección
T6Chr15F	GGCTGTCATCAAGTGGCTCAA	64°	qPCR delección
T6Ch15R	ACCAGATACACGACTCCCTTG	64°	qPCR delección

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para detección de indels

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
FOXG_01365F	GAGAGTCGGAGAGCAAGAAGT	64°	qPCR delección
FOXG_01365R	CCCTACCATTGCTCCTGGAA	64°	qPCR delección
FOXG_01365R2	GTGGTTGAGTCGTCCTGATAG	64°	secuenciación

VelBY2F	CCTACCAACAACACCAGCATC	64 ^o	Detección deleción
VelBY2R	GGAGGAGGAGGTTTCATCATGT	64 ^o	Detección deleción
CNV1_M3F	CATCCTGGGCAAATGAGGGG	64 ^o	Detección deleción
CNV2_M3R	GAAGCCCAATTCCTCCAAGTG	64 ^o	Detección deleción
CNV3_M3F	AACAACCCCTCCACGAGTCA	64 ^o	qPCR deleción
CNV4_M3R	TCTCCACGCATTGCATCACAG	64 ^o	qPCR deleción

Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para la detección de SNPs

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
FOXG_21576F	ACCCTTGTGAGCAGCTATACC	64 ^o	RFLP
FOXG_21576R	TTTCTCTCTTAAACTTCGTATTACT	64 ^o	RFLP
FOXG_10197F	GCCGAGAGATGAATCACCTTA	64 ^o	RFLP
FOXG_10197R	TTCTTGGAATCAGCTCCTCC	64 ^o	RFLP
FOXG_11096F	CGAGACTGGTTGTGCTCCCT	64 ^o	RFLP
FOXG_11096R	AGCAGACCAGCTGGTGGTAC	64 ^o	RFLP
FOXG_21691F	GATCCTGGGGCTATACGCAC	64 ^o	RFLP
FOXG_21691R	TATCAAGGAGTAACAGAAGCCT	64 ^o	RFLP
U_45R	GTTAAAGGCAGGGTTATAGTAG	62 ^o	RFLP
U_45F	TACCCTGAACCTCACGAACCTTT	62 ^o	RFLP
FOXG_00985F	AGGATGGGAAGAACGAGTACG	64 ^o	RFLP
FOXG_00985R	ACGGGTTTGCTTTCTTGGGTC	64 ^o	RFLP
FOXG_09817F	TGGTACAGGGGTTTCGTTTTCG	64 ^o	RFLP
FOXG_09817R	ACCTTACCCAGAGCTTCCACA	64 ^o	RFLP
FOXG_19617F	CGTTCTTGCTCCGATGGTTGT	64 ^o	RFLP
FOXG_19617R	TCTTGCATCGATCTGGGGAAG	64 ^o	RFLP
FOXG_11967F	AGTTGAACATTGGACCGGAGG	64 ^o	RFLP
FOXG_11967R	TGGAAGTCAGCGAGAGGAAGT	64 ^o	RFLP
FOXG_07021R	CAAAGCATGGGTTTCAAGATAA	62 ^o	RFLP
FOXG_07021F	GGTCAATGAGTTCCTGTTCT	62 ^o	RFLP
FOXG_22360F	CAGCTCCCAGTTTCATCAAGG	64 ^o	RFLP
FOXG_22360 R	GGGGAGGCATGACAACACAC	64 ^o	RFLP
S_14.4 F	ATGAGCGGTAGTGTAGAGGTG	64 ^o	RFLP
S_14.4 R	AGACAGCAGGCGAGGGAAATA	64 ^o	RFLP
FOXG_01429 F	AAGCTCGACGGGCAACGGAT	64 ^o	RFLP
FOXG_01429 R	TGGCTGATACGATGTGGGTGA	64 ^o	RFLP
VelBY4F	TCCCCTACCGACCATCAGAA	62 ^o	RFLP
VelBY4R	CAACTTCAGCGTCAGCAATCA	62 ^o	RFLP
FOXG_20948 F	CTGACGAGGGATGGGAACAAT	64 ^o	RFLP
FOXG_20948 R	TGTGAGAAAGCCAGTGAAGCC	64 ^o	RFLP
FOXG_09359 F	GGTGCTGGTGAATCTGGAAAG	64 ^o	RFLP
FOXG_09359 R	GAATCGAAGAGAGTGAGAGCC	64 ^o	RFLP
FOXG_05940 F	AGGGTTTGTATCAGAGGACGG	64 ^o	RFLP
FOXG_05940 R	CGCGTTTTTTCTGCTTGGGT	64 ^o	RFLP
U_2 F	CTGTTGGTGAATGGATGGAGT	62 ^o	RFLP
U_2 R	TTCAACTGGTGGTGTCTCTC	62 ^o	RFLP

Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para detección de transposones

Nombre	Secuencia	Tm	Uso
FOXG_22509F	ACATCCGTCATGCAACAGACC	64°	Detección hormint
FOXG_22509R	GGTCAGTAGGAAGATGCTGGA	64°	
08732F	CATATCAGGGACCAAAGAAGTC	64°	
08732R	ACGGTCAAGGTCAATCCACAG	64°	
FOXG_12102F	CTGGGTTTTGAGGGTATCGTC	64°	Detección hormint
FOXG_12102R	TGGGCTGAGGAGGATCAAGAA	64°	
FOXG_04683F	CTTCTTGACTACTGCCACACC	64°	Detección hormint
FOXG_04683R	CCTCCGAAACCTCATCATCCT	64°	
FOXG_13444F	GATGTTCCCTTTCTGCCCTCA	64°	Detección Merry
FOXG_13444R	TCTCCAACCTTCTCCTCGTG	64°	
02937F	GGACAAGAAGAAAAGGCAGGG	64°	
02937R	GTGAGAACATCCTGGTGTCTGT	64°	
FOXG_06466F	CCCTTGCTTCATAGACCTCCT	64°	Detección Merry
FOXG_06466R	TGGCTTGCATCAGACTTGTGG	64°	
S_6.1F	ATAGGCTCCACTTCCACATGC	64°	Detección FOT 5
S_6.1R	GATGGCAAGAGCGGAAGTTGA	64°	
FOXG_17251F	CGGATTCTTGGTCTCGATGCT	64°	Detección HAT 1
FOXG_17251R	CAAGAAGCCAAGGACGAGGAA	64°	
FOXG_22586F	ACTTTCTGGACTGCCTACGTG	64°	Detección hormint
FOXG_22586R	CCGTTCCGACTGTTGTGAGTT	64°	
08909F	GGGTTACAGGAATGGGCTATC	64°	
08909R	GAGGATGTGTCTTTCAGAGGG	64°	
U_32F	CATTAGCTATAAAAGACCTACCT	62°	Detección HAT 1
U_32R	GTAAGAAGGGTTAAAAGCTAGG	62°	
FOXG_21846F	GAACGAGAGGAGAGGAGAAGA	64°	Detección hormint
FOXG_21846R	TGTTTCGATGCTGGTTCGCTA	64°	
Hornet_Y_F	AGACGGACAAAGAGGTGTGAC	64°	Detección hormint
Hornet_Y_R	CTCGACACTACCAGGCACTAT	64°	Detección hormint
Hornet_Y_F2	GCATTGATCGTGAATAGAAGGC	64°	Cuanti nº de copias
FOXG_09993F	TCCTCCTGGGTTTCTTGTCAC	64°	Detección hormint
FOXG_09993R	CTCTTGAACGTGGTGCAGAC	64°	
FOXG_08908F	GGTTGCCTTGAAGTACGCATC	64°	Detección hormint
FOXG_08908R	ACTTGTCTCCCATTCTCAGCC	64°	
FOXG_10796F	TGGAGGCAAAACGTCAAGCTG	64°	Detección hormint
FOXG_10796R	ATCATCGACTGCCACTACC	64°	
FOXG12897F	CCGTTCTACTACCCTTCTCA	64°	Detección hormint
FOXG12897R	GGTGGGGAAAGATCAAAGCAC	64°	
FOXG_13710F	GCCAACAGGGTATGGATTGAC	64°	Detección hormint
FOXG_13710R	AATGTTCTAGCGAGCAACCCC	64°	

11.3. Electroforesis de ácidos nucleicos

11.3.1. Electroforesis de ADN

La separación e identificación de moléculas de ADN o ARN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración variable del 0,7-2 % (p/v), dependiendo del tamaño y la naturaleza de la molécula a separar.

1. Se añadió la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de tampón TAE 1X y se fundió por ebullición en un microondas.
2. Se dejó enfriar hasta unos 55-60 °C. En este punto, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 0,5 µg/mL.
3. Se vertió el gel en la bandeja de electroforesis y se dejó que polimerizara.
4. Se prepararon las muestras añadiendo tampón de carga 6X en proporción 4:1 (v/v).
5. Se llevó a cabo la electroforesis en tampón TAE 1X aplicando un voltaje aproximado de 2-5 V/cm de longitud de la cubeta, incluyendo marcadores de ADN de pesos moleculares conocidos.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se fotografiaron los geles con una cámara digital Kodak modelo DC290 con filtro Wratten 22A.

Tampón TAE 50X: Tris-acetato 2 M, pH 8; EDTA 50 mM. Se pesaron 242 g de Tris, se añadieron 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8

Tampón de carga 6X: Sacarosa al 40% (p/v); azul de bromofenol al 0,25% (p/v); xilenocianol al 0,25% (p/v).

Marcadores de tamaño de los fragmentos de ADN: 1 KB plus DNA Marker (Enzimax), que contiene fragmentos desde 75 pb a 20 kb.

11.3.2. Electroforesis de cromosomas CHEF (Pulsed field gel)

La separación e identificación de cromosomas enteros de *F. oxysporum* en los diferentes aislados se realizó mediante electroforesis por campos pulsados.

1. Se preparó el gel al 1 % de agarosa Certified Megabase de BioRad con el volumen necesario de tampón TBE 0,5X y se fundió por ebullición en un microondas.
2. Se dejó enfriar hasta unos 55-60 °C antes de verterlo en la bandeja de electroforesis donde se dejó polimerizar durante 1 hora.
3. Para manipular las muestras dispuestas en bloques de agarosa low melting (Lonza) se utilizaron dos espátulas. La carga de los bloques se realizó junto con los marcadores dispuestos de manera conjunta.
4. Tras la carga de los bloques todos los pocillos se sellaron con la misma agarosa LM.
5. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 0,5X estéril durante 240 horas con un flujo de 700 mL/min; Swich time 1200-4800 s; 1.5 V/cm; ángulo 120 ° y una temperatura constante de 14 °C. El buffer se cambió cada dos días.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta tras teñir el gel durante 30 min con una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/mL.

Tampón TBE 10X: Tris-base 0,9 M, pH 8; EDTA 20 mM; Acido bórico 0,9 M. Se pesaron 108 g de Tris, se añadieron 55 g mL de Ácido bórico acético y 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8.

Marcadores de tamaño de los fragmentos de ADN: de *Sacharomices cerevisiae* (0,2-2,2 Mb) y *Schizosaccharomyces pombe* (3,5-5,7 Mb).

11.3.3. 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 GENE CLEAN® Turbo kit (MP), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y el pH adecuado para la unión del ADN a la membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

11.3.4. Transferencia y fijación de ADN de geles de agarosa a membranas de nailon (Southern blot)

Se realizaron digestiones de aproximadamente 2 µg de ADN genómico obtenido a partir del micelio de las distintas cepas para analizar. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %, con bromuro de etidio y un voltaje bajo (2 V/cm de longitud de la cubeta). Una vez fotografiado, el gel fue sometido a los siguientes tratamientos:

1. Se trató con HCl 0,25 M durante 15 minutos (2 veces) en agitación moderada, con el fin de fragmentar las moléculas de ADN mayores de 10 kb (hidrolisis acida).
2. Se sumergió el gel en la solución de desnaturalización con 0,5N NaCl durante 15 minutos (2 veces), también en agitación moderada.
3. Se sumergió en la solución de neutralización, Tris pH=7,2:1,5M NaCl durante 30 minutos (2 veces), también en agitación.
4. La transferencia se llevó a cabo por capilaridad desde el gel a una membrana de nailon cargada positivamente, (Roche). Para ello, el gel se situó sobre una cama de electroforesis en posición inversa y recubierta con papel de filtro en contacto con una cubeta de tampón SSC 10X, sobre el papel de filtro 3 hojas de papel de filtro Whatman® 3MM saturadas con tampón SSC 10X. Sobre el gel se colocaron sucesivamente, la membrana

de nylon del tamaño del gel, 3 papeles Whatman 3MM saturadas con tampón SSC 3X, 3 papeles Whatman 3MM secos y una pila de papel absorbente y un peso aproximado de 0,5 kg. Es importante la eliminación de las burbujas de aire que se puedan formar al superponer las distintas capas. La transferencia por capilaridad así dispuesta se mantuvo, al menos, durante 12 h.

5. Finalmente, la fijación del ADN se realizó incubando la membrana a 80 °C durante 90 min.

Solución de desnaturalización: NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M. Solución de neutralización: NaCl 3 M; Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5. SSC 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M. Se ajusta a pH 7.0 con NaOH.

Tampón 10x SSC: 1,5 M NaCl; 0,15 M Citrato sódico, pH 7,0.

11.3.5. Tratamientos con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por las casas comerciales Roche (Basilea, Suiza) y New England (Ipswich, Massachusetts, EE UU).

Los tratamientos de ADNg para los análisis Southern se realizaron con una única enzima de restricción según el diseño experimental indicado en cada caso, junto con el tampón y a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante. Se utilizaron 1-2 U de enzima por cada µg de ADNg, sin que el volumen añadido superara nunca el 10% del volumen total. El tiempo de digestión osciló entre 12-14 horas.

11.3.6. Clonación de fragmentos de ADN en vectores

La ligación de fragmentos de ADN a vectores linealizados se llevó a cabo utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (Roche), utilizando normalmente una relación molecular 3:1 de inserto y vector, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial pGEM[®]-T Vector System (Promega) 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[®].

11.4. Cuantificación de eventos

11.4.1. Cuantificación de SNPs

Para el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) se utilizó el ADN generado en una PCR previa.

Tras un estudio previo del SNP generado, se diseñó una estrategia de detección a través de enzimas de restricción para generar un corte en la secuencia previamente amplificada por PCR. Los fragmentos generados se calcularon para que tuvieran tamaños fácilmente diferenciables en una electroforesis posterior. Cada tratamiento se realizó con la enzima, según el diseño experimental en cada caso, en una proporción de 1/25 por cada 100 ng de ADN añadido a la mezcla, junto con el tampón y a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante. El tiempo de digestión osciló entre 1.5-4 horas.

En todos los casos se incluyeron controles positivos y negativos.

11.4.2. Cuantificación de transposones

En los casos en los que la amplificación por PCR producía dos fragmentos de tamaño muy diferente, como sucede con el salto de un transposón, se calculó un coeficiente de corrección de la banda más grande (cuya amplificación es menos eficiente) respecto a la banda más pequeña (más eficiente). Para ello se realizó una curva patrón a partir de mezclas de ADN del alelo silvestre y del alelo con transposón, en proporciones conocidas y calculadas de manera exacta con el

kit comercial fluorimétrico Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrofotómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España).

El ADN cuantificado se diluyó con agua estéril ultra pura para obtener una concentración de 10 ng/ μ l. Las curvas estándar para los ensayos de PCR se obtuvieron con porcentajes conocidos de un aislado monospórico (alelo con transposon) respecto a la cepa silvestre (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 y 90:10). En cada análisis se incluyeron reacciones con ADN tanto de la cepa silvestre como del aislado monospórico como control de los tamaños esperados. Se obtuvieron las curvas estándar de ADN, a partir de la cual se establecieron equivalencias entre las proporciones detectadas en la PCR y las reales. El valor final de la frecuencia alélica se obtuvo aplicando al valor inicial de cada muestra el factor de corrección obtenido en la curva patrón

11.4.3. Cuantificación de fragmentos

La cuantificación de fragmentos de PCR de diferentes tamaños se realizó mediante medidas de intensidad de las bandas obtenidas con el software Multiguage de Fujifilm. A partir de los datos, se establecieron las proporciones relativas entre las bandas de los dos alelos diferentes con un sumatorio considerado como 100%.

12. Transformación de organismos

12.1. Transformación de *E. coli*

12.1.1. Preparación de células competentes

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

1. Una colonia fresca de *E. coli* DH5 α se inoculó en 5 ml de PSI-b y se incubó 12 horas a 37 °C en agitación.
2. 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.
3. A continuación, se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 6.000 rpm. Seguidamente, las células se resuspendieron con cuidado en 40 mL de solución Tfb-1 fría.
4. Se dejó incubar de nuevo 5 minutos en hielo para volver a centrifugar a 4 °C durante 5 minutos y 6.000 rpm, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 4 mL de solución Tfb-2 fría.
5. Por último, se repartieron en alícuotas de 100 μ l en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

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.

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.

Solución Tfb-2: 10 mM MOPS pH 7; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl y 15% glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

12.1.2. Transformación

Las células competentes se descongelaron incubando en hielo. A 50 μ L de éstas se les añadieron 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 1 minuto 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 μ L 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.

12.2. Transformación de *F. oxysporum*

12.2.1. Preparación de protoplastos para transformación

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (Powell & Kistler, 1990), con algunas modificaciones. Se empleó el gene hygromicina (HYG) como marcador de selección en los diferentes transformantes.

1. A partir de un stock de microconidios en glicerol de *F. oxysporum* se inoculó un matraz de PDB y se incubó durante 3-4 días a 28 °C con agitación. Pasado este tiempo, se recogieron las esporas frescas (apartado 5.2.1).
2. Se inocularon $5 \cdot 10^8$ microconidios totales en 200 mL de medio PDB.
3. Después de 12-14 h a 28 °C, las germínulas obtenidas se recogieron por filtración a través de dos filtros de nailon (monodur 10-15 μm) superpuestos y se lavaron con unos 200 mL de solución OM. Las germínulas se recogieron con ayuda de una espátula estéril y se resuspendieron en un volumen de 30 ml de OM por cada 1,5 g de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (Glucanex)
4. La incubación se realizó a 30 °C y 60 rpm entre 1-1,5 h dependiendo de la estirpe.
5. Transcurrido este tiempo, se comprobó la formación de protoplastos mediante observación microscópica hasta que el número y la calidad de los protoplastos fueron los adecuados.
6. Una vez obtenidos los protoplastos, éstos se recogieron por filtración a través de dos filtros de nailon, lavándose las paredes con solución de STC.

Los restos de micelio quedan retenidos y los protoplastos pasan a través del nylon a los tubos de centrifugación Corex mantenidos en todo el proceso en hielo.

7. La suspensión se centrifugó a 4 °C y 3000 rpm durante 15 minutos para sedimentar los protoplastos.
8. Los protoplastos se resuspendieron, con cuidado para no romperlos, en aproximadamente 1 mL de solución STC y se determinó su concentración mediante observación al microscopio en una cámara Thoma (ver apartado...). La concentración de la solución se ajustó a $3 \cdot 10^8$ protoplastos/mL y se repartieron en alícuotas de 100 μ L.
9. A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80 °C en 10% PEG (v/v) y 1% DMSO (Merck) (v/v).

Solución OM: 1,2 M $MgSO_4$; 0,1 M Na_2HPO_4 , pH 5,8-6 ajustado con ácido ortofosfórico. Esterilizar por filtración.

Solución STC: 0,8 M sorbitol; 50 mM $CaCl_2$ y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Solución PEG: 60% polietilenglicol 4000 (p/v) en 0,6 M MOPS.

12.2.2. Transformación

Para la transformación de protoplastos se utilizó el protocolo descrito por Malardier (Malardier et al, 1989), con algunas modificaciones.

1. Se mezclaron 1-2 μ g de ADN transformante con 10 μ L de 0,1 M ácido aurintricarboxílico (ATA) (fuerte inhibidor de nucleasas) y se llevaron hasta un volumen final de 60 μ L con solución TEC. Paralelamente, se preparó un control sin ADN con 10 μ L de ATA y 50 μ L de solución TEC. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos.
2. El ADN se centrifugó a 13.400 rpm durante 2 min y el sobrenadante se mezcló suavemente con los protoplastos.
3. Nuevamente, se incubó en hielo durante 20 minutos y se añadieron 160 μ L de PEG con otros 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

4. Para mantener los protoplastos en una solución osmótica adecuada se añadió 1 mL de solución STC a la mezcla anterior y se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm. El pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de solución STC.
5. Posteriormente se mezclaron alícuotas de 50 μ L de los protoplastos transformados con 3 mL de agar de cobertera, precalentado a 45 °C, y se sembraron en medio mínimo de regeneración sólido.
6. En el caso del control, se realizaron diluciones seriadas 10^{-3} y 10^{-4} en STC para realizar el control de regeneración de los protoplastos mezclando 100 μ L de cada una con 3 ml de agar de cobertera y sembrado en las mismas condiciones anteriormente descritas.
7. Además, se realizó una dilución 10^{-1} en agua desionizada estéril de la solución 10^{-3} en STC para determinar el porcentaje de esporas presentes no susceptibles de ser transformadas. Un último control se realizó mezclando 190 μ L 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 que dependerá del antibiótico de selección utilizado en cada caso.
8. Para la selección con higromicina B los protoplastos se incubaron durante 14 horas a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 mL de agar de cobertera con el antibiótico de selección a las placas anteriores excepto en los controles de regeneración y de esporas.
9. Por último, se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias con fenotipo transformante.

Solución TEC: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl₂.

Antibióticos: 2 mg de higromicina B

12.2.3. Preparación de protoplastos para CHEF

Para obtener protoplastos se siguió el protocolo estándar explicado en el apartado anterior 7.2.1 con alguna modificación respecto a las soluciones empleadas en el proceso. Además, las centrifugaciones se realizaron a 2500 rpm.

Por último, los protoplastos se resuspendieron en STE a una concentración de 4×10^8 prot/mL para ver cromosomas en gel.

Solución MgSO₄: 1,2 M MgSO₄; pH 5,8-6 ajustado con ácido ortofosfórico. Esterilizar por filtración.

Solución Sorbitol: 1 M sorbitol.

Solución STE: 1 M sorbitol; 50 mM EDTA y 25 mM Tris-base, pH 7,5 ajustado con NaOH.

12.2.4. Tratamientos de protoplastos para CHEF

Los siguientes pasos se realizaron inmediatamente después de haber resuspendido los protoplastos en STE.

1. Una vez estandarizada la concentración final de protoplastos se mezcló un volumen de agarosa LowMelt al 1,2 % en STE conteniendo 2 mg/mL de pronasa o 1 mg/mL de proteinasa K.
2. Tras la homogenización con pipeta se dispensó en un molde de tamaño adecuado (BioRad).
3. Se dejó solidificar durante al menos 15 min a 4 °C.
4. Transcurrido el tiempo adecuado los bloques solidos se desmoldaron cuidadosamente en 5 vol de una solución de NDS suplementado con 2 mg/mL de pronasa.
5. Seguidamente, se incubaron los bloques a 50 °C con una ligera agitación de 60 rpm durante toda la noche.
6. Finalmente se desechó la solución NDS para hacer tres lavados con Wash buffer (WB) a temperatura ambiente y ligera agitación.

7. Los bloques se conservaron a 4 °C en WB hasta su utilización (estables de 3-6 meses)

Solución NDS: 10 mM Tris-base; 50 mM EDTA; 1% de Laurilsarcosyl pH 9,5 ajustado con NaOH.

Solución Wash Buffer: 50 mM EDTA; pH 8 ajustado con NaOH.

12.3. Análisis de la estructura de la cromatina

Este análisis permite detectar posibles cambios en el estado de empaquetamiento de la cromatina como resultado de distintos factores.

Se pesaron exactamente 20 mg de polvo de micelio liofilizado y se resuspendieron en 1 mL de buffer de digestión. Una vez homogeneizada la mezcla se repartió en alícuotas de 300 µL en dos tubos previamente preparados y conservados en hielo; uno de ellos con 1 vol de Buffer Stop y otro con 3 U de MNasa (Sigma). Ambos tubos se mezclaron vigorosamente con un vortex; el que contenía el Buffer Stop se preservó en hielo y el que contenía la MNasa se incubó a 37 °C durante 5 min exactos con agitación de 5 segundos cuando se cumplió la mitad de tiempo. Pasados los 5 min de incubación se añadió 1 vol de Buffer Stop y se mezcló con un vortex.

Para aislar el ADNg.

1. Se añadió 1 vol de fenol:cloroformo:isoamilalcohol.
2. Se mezcló vigorosamente con un vortex y se centrifugó 10 min a máxima velocidad.
3. 400 µL de la fase acuosa superior se transfirieron a un tubo nuevo de 2 mL.
4. El ADN se precipitó con acetato sódico e isopropanol y se incubó toda la noche a -20 °C.
5. Seguidamente se realizó un lavado con EtOH al 70 %, se resuspendió cada muestra en 100 µL de H₂O MQ y trato con RNAsa.

6. Para hacer las qPCRs se diluyó la muestra (1/3 v/v) y se usó 5µL en cada replica tecnica

Buffer de digestión: 250 mM sacarosa; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 3 mM MgCl₂

Buffer STOP: 2% SDS; 40 mM EDTA

13. Experimentos de inducción de sectores

13.1. Generación de variantes de crecimiento y aislamiento

Para la generación de mutantes espontáneos a partir de la cepa silvestre se utilizaron distintas fuentes de nitrógeno en un medio MMP convencional.

Los distintos compuestos químicos usados como fuente de nitrógeno se muestran en la tabla X: Nitrato (NaNO₃), Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄), Metionina (C₅H₁₁NO₂S), Urea (CO₂(NH₂)₂), Hidroxiurea (CH₄N₂O₂), Glutamina (C₅H₁₀N₂O₃) y Ácido Glutámico (C₅H₉NO₄). El cálculo de las concentraciones de las distintas fuentes se estableció ajustando al número de moléculas de Nitrógeno existentes en el MMP original con Nitrato de Sodio (Figura 9).

La preparación de los distintos compuestos nitrogenados se realizó de manera separada del resto de componentes del medio mínimo para evitar cambios por el autoclavado. Para ello se generaron soluciones stock 20X, esterilizadas por filtración, de los diferentes compuestos y se añadieron al medio templado en la cantidad adecuada.

Cada placa se inoculó una gota con $5 \cdot 10^4$ microconidios totales y se realizaron seis placas por condición.

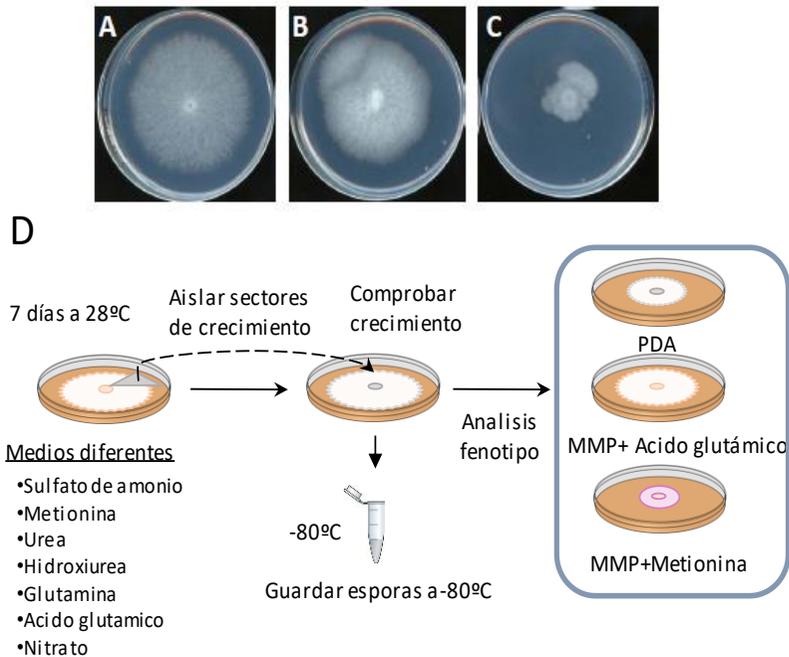


Figura 9. Aislamiento de variantes de crecimiento a partir de una colonia de la cepa clonal wt en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno. (A-C) La cepa clonal de wt (10^6 microconidios) se inoculó en el centro de la placa, se incubó durante 7 días a 28°C y tras una comprobación visual se aislaron sectores que mostraron un crecimiento diferente, generalmente más rápido (variantes de crecimiento). (D) Una vez purificado mediante un cultivo monospórico se clasificaron según fenotipo diferencial respecto a la cepa original sobre tres medios (PDA; MMP + ácido glutámico; MMP + metionina).

Las variantes de crecimiento fueron detectadas de visu en las colonias de 5-6 días mediante un crecimiento diferenciado en forma de sector más rápido. Una vez identificadas, las variantes de crecimiento se aislaron con ayuda de un palillo estéril y se llevaron a una nueva placa Petri con el mismo medio de origen, en condiciones de esterilidad. Tras el aislamiento, se generó, de cada uno y de manera independiente, un cultivo monospórico en dos pasos. y se caracterizaron fenotípicamente respecto a la cepa silvestre en tres medios: PDA y MMP al que se le añadió Ac. Glutámico (MM+Ac. GLU) o Metionina (MM+Met) en lugar de Nitrato.

13.2. Cuantificación del número de variantes de crecimiento

Con el fin de cuantificar la tasa de mutantes espontáneos generados en una misma colonia, se diseñó un experimento que permitiera estudiar un número alto de colonias inoculadas en una misma placa. Para ello se utilizó el compuesto metionina (50 mM) como fuente de nitrógeno en medio MMP. Este aminoácido actúa sobre el crecimiento como un restrictor de colonia lo que permite cuantificar las variantes de crecimiento generadas.

En cada placa se inocularon cuatro gotas con 10^6 microconidios totales. Las variantes de crecimiento generadas fueron detectadas de visu en las colonias de 5-6 días mediante un crecimiento diferenciado en forma de sector más rápido.

14. Experimentos de evolución en diferentes condiciones ambientales

14.1. Diseño experimental general

En todos los experimentos de evolución se partió del mismo clon de la cepa silvestre. Se diseñaron las diferentes condiciones con cinco líneas independientes entre sí y diez pasajes seriados (Figura 10).

En todos los casos, cada pasaje se inoculó con una población recogida del anterior y se mantuvo en las mismas condiciones de concentración de microconidios seleccionadas de partida en cada experimento.

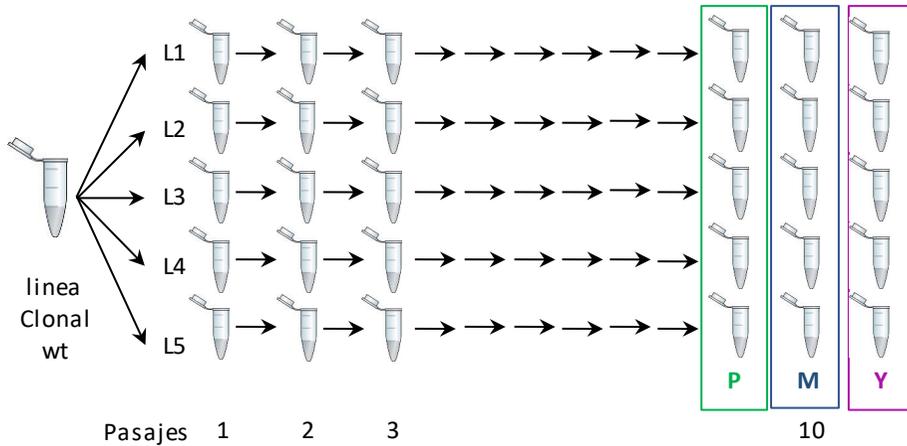
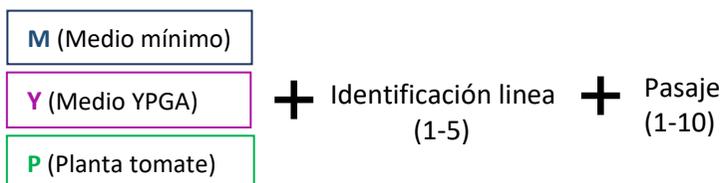


Figura 10. Diseño general de evolución experimental utilizado para las tres condiciones (planta, medio completo, medio mínimo). A partir de la línea clonal de la cepa silvestre (wt) se evolucionaron cinco líneas independientes (L1-L5) en tres condiciones distintas: infección de raíces de plantas de tomate (P, verde); medio sólido medio sólido Mínimo (M, azul); completo YPGA (Y, morado). En cada línea se realizaron 10 pasajes seriados (1-10). Después de cada pasaje se conservó una muestra de microconidios a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

14.1.1. Identificación y nomenclatura de las muestras generadas

Para la identificación de las distintas muestras generadas, se decidió utilizar una nomenclatura fácil y corta en la que se resumiera la información básica de cada muestra almacenada. De esta manera, la identificación de la condición evolutiva utilizada se realizó a través de una letra M, Y o P (Medio mínimo, Medio YPGA y Planta de tomate) seguida de un número del 1 al 10, según el pasaje donde se había recogido la muestra, y por último otro número del 1 al 5 para la identificación de las distintas líneas independientes.



14.2. Evolución en medio sólido con MM y YPGA

Para la realización del experimento de evolución en medio sólido controlado se utilizaron dos medios diferentes, uno considerado pobre, Medio Mínimo Puhalla (ver apartado 8.2) y otro considerado rico, YPGA (Figura 11).

Sobre el centro de una placa Petri de 90 mm se inoculó una gota de 10 μL con 10^6 microconidios totales. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días; pasado este tiempo se recogió toda la colonia crecida en la placa. Para ello se añadieron 5-6 mL de agua MQ y se rascó con cuidado toda la superficie de la placa con una espátula previamente flameada en condiciones de esterilidad. El sobrenadante resultante se homogeneizó con una pipeta para desprender los microconidios adheridos al micelio y se procedió a su separación a través de un sistema de filtrado estéril. Este sistema se compone de una punta de pipeta de 5 mL con un algodón dentro introducida en un tubo Falcon de 15 mL. Tras una decantación por gravedad se realizó el recuento de los microconidios recogidos con ayuda de un microscopio y un hemocitómetro y se ajustó a la concentración de inicio para realizar el siguiente pasaje.

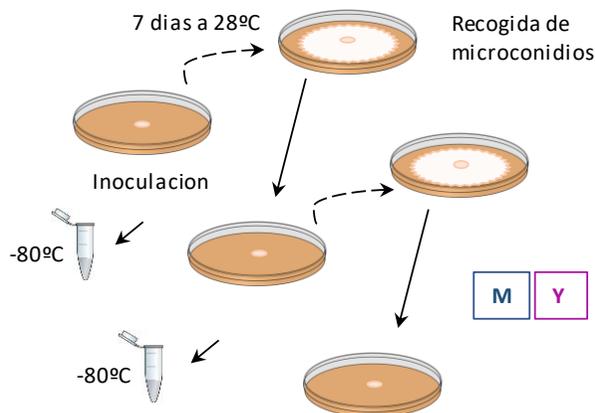


Figura 11. Evolución experimental mediante pasajes seriados a través de medio mínimo (M) o medio completo YPGA (Y). La cepa clonal de wt (10^6 microconidios) se inoculó en el centro de la placa, se incubó durante 7 días a 28°C y se recogieron los microconidios a partir de toda la colonia aplicando 4 ml de agua y posterior filtrado, para su almacenamiento a -80°C y para el siguiente pasaje de inoculación.

Con los datos del recuento se calculó el cuello de botella generado según lo recogido en cada placa y la concentración inicial fijada para cada pasaje. El sobrante de cada línea y cada pasaje se guardó en 30% glicerol a -80 °C.

14.3. Evolución en huésped vegetal (plantas de tomate)

Para la evolución en huésped vegetal se utilizó la variedad Mónica de plantas de tomate con 14 días de vida según el procedimiento descrito en el apartado 9.3. Cada planta se separó con extremo cuidado de la vermiculita para no romper las raíces y cuando fue necesario se descartaron las que no reunían las condiciones de integridad exigidas.

Para cada línea generada se utilizaron dos plantas incubadas durante 30 min en 50 mL de una suspensión con 10^7 microconidios/mL. El trasplante se realizó de manera individual sobre alveolos independientes y perfectamente identificados de unos 100 cm³ de capacidad con nueva vermiculita. En cada pasaje se incluyó además una planta control (sin inocular) para descartar contaminaciones externas y facilitar la identificación de los primeros síntomas de la enfermedad. Transcurridos 12-14 días tras la infección, con la planta entera, aunque con algún síntoma leve visible en las hojas verdaderas, se procedió a su retirada para el aislamiento del hongo. Tras la retirada de la vermiculita se realizó una desinfección superficial de la planta en una solución de hipoclorito sódico al 1 % durante 2 min seguida de dos enjuagues con agua estéril de 2 min cada uno. El tiempo de exposición al desinfectante fue optimizado previamente para asegurar la integridad del tejido vegetal y por tanto el aislamiento de *Fusarium* del interior (Figura 12).

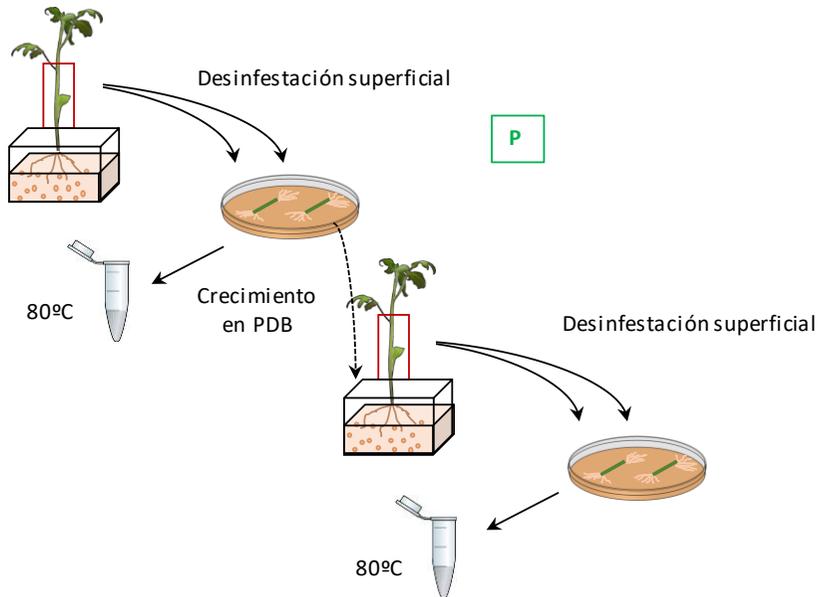


Figura 12. Evolución experimental mediante pasajes seriados a través de plantas de tomate. La cepa clonal de wt ($5 \cdot 10^8$ microconidios) se inoculó en raíces de plantas de tomate. Transcurridos 12-14 días, se obtuvieron fragmentos del tallo, se sometieron a una desinfección superficial, se transfirieron a placas de PDA y se incubaron a 28°C durante 36 horas. El micelio crecido desde el interior del tallo (preferentemente de la zona apical), se transfirió a medio PDB y se incubó a 28°C durante 36 horas para alcanzar el número de microconidios necesarios para su almacenamiento a -80°C y para el siguiente pasaje de inoculación.

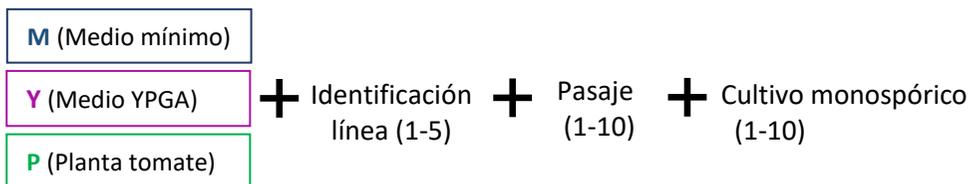
Para el aislamiento de *Fusarium* se descartaron la raíz y las hojas. El tallo se cortó en tres trocitos con ayuda de un bisturí estéril y cada trocito fue introducido levemente en una placa de Petri de 90 mm con medio PDA con ampicilina y kanamicina.

La disposición se realizó de manera ordenada, identificando cada trozo de la misma planta según el siguiente criterio; R: próximo a la raíz, M: tramo medio, A: próximo a las hojas. Las placas se incubaron durante 1,5 días a 28 °C tras los cual se recogió el micelio crecido de las dos plantas inoculadas, con preferencia de las zonas apicales. Para la obtención de los microconidios suficientes para la inoculación de las plantas del siguiente pasaje, fue necesario incluir un paso en PDB de 2 días.

15. Aislamiento monospórico

15.1. Origen del aislamiento

Dado que el resultado de cada pasaje en las distintas condiciones ensayadas era el de una población de individuos previsiblemente heterogénea se decidió realizar 10 aislamientos monospóricos del último pasaje en las distintas líneas generadas. Para ello, se sembró con un asa de Digrafsky un número controlado de microconidios que osciló entre 100-150. El medio utilizado para realizar este proceso fue el correspondiente al utilizado en la obtención de las líneas evolucionadas, esto es MM, YPGA y PDA. Se seleccionaron de manera aleatoria 10 colonias perfectamente aisladas de la placa y con ayuda de un palillo estéril se realizó un trasplante a una nueva placa. La identificación de los distintos cultivos puros se realizó mediante un último número identificativo del 1 al 10 según el siguiente esquema.



1.1 Dos pasajes monospóricos

Para asegurar la pureza de las colonias seleccionadas se generó un cultivo monospórico en dos pasos. De cada colonia se tomó una muestra con ayuda de un palillo estéril que fue introducido en un Eppendorf con 500 µL de agua MQ estéril. Seguidamente, se sembraron 50 µL en una placa con el medio adecuado según el origen evolutivo de la muestra. Nuevamente se aisló una colonia y se repitió el mismo proceso una vez más.

16. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y mutantes evolucionados: Simulación en 1 pasaje

16.1. Co-inoculación en placa

Con este ensayo se pretendió estudiar una posible ventaja evolutiva de los mutantes obtenidos en la evolución experimental sobre medio de cultivo en placa frente a la cepa silvestre original wt. Con este objetivo, se decidió co-inocular una suspensión de microconidios en una proporción 1:1 de cada cepa en condiciones análogas a la evolución experimental sobre una placa Petri con medio YPGA. Las condiciones empleadas fueron las mismas utilizadas para en el ensayo de evolución (ver apartado 9.2)

Para establecer las condiciones de partida utilizadas en el ensayo se realizó un control de inicio de la suspensión de conidios utilizada. Cada mezcla de aislados, una vez terminada la inoculación de las placas, se centrifugo durante 10 min a 10.000 rpm tras lo cual se eliminó el sobrenadante dejando solo el pellet de conidios. Las muestras generadas fueron conservadas a -80 °C hasta su liofilizado y posterior extracción de ADN según el método estándar descrito anteriormente en el apartado 10.2.

16.2. Co-inoculación en planta

Para estimar la posible mejora en la capacidad de colonización de plantas de tomate, se realizó un ensayo de co-inoculación de algunos aislados monospóricos junto con la cepa silvestre en proporciones de partida 50-50 %. Se utilizaron nuevamente las condiciones empleadas en el ensayo de evolución, donde se inoculó la raíz de plantas de 14 días de vida con una suspensión de conidios (ver apartado 14.3). Trascorridos entre 12-14 días desde la infección, se recogieron las plantas a las que se les separaron por un lado la raíz y por otro la

parte superior del tallo (2/3 partes superiores). Cada experimento contó con tres replicas biológicas de tres plantas cada una a las que se les extrajo el ADN tal y como se describe en el apartado 10.2.

17. Ensayos fenotípicos

17.1. Velocidad de crecimiento en placa.

Para realizar este ensayo, se prepararon diluciones ajustadas a 10^8 microconidios/mL y se inocularon 10 μ L en el centro de una placa Petri con medio PDA. La velocidad de crecimiento se calculó por la diferencia de áreas generadas a partir del escaneo de las placas crecidas tras 48 y 72 h.

El análisis de las áreas en cada caso se realizó con el editor de imagen MultiGauge.

17.2. Nivel de esporulación en medio solido

Para evaluar la capacidad de esporulación en medio solido sobre medio YPGA se inocularon en el centro de una placa Petri de 90 mm 10 μ L con 10^8 microconidios/mL. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días; pasado ese tiempo se recogió toda la colonia para lo que se añadieron 2 mL de agua MQ y se rascó con cuidado toda la superficie de la placa con una espátula estéril. La muestra se homogeneizó con una pipeta para desprender los microconidios adheridos al micelio y se procedió a su separación a través de un sistema de filtrado estéril.

17.3. Nivel de esporulación en medio líquido.

Para evaluar la capacidad de esporulación en medio líquido, se inocularon $1,5 \cdot 10^8$ microconidios totales de cada estirpe en matraces con 5 mL de medio PDB, YPG o MMP.

Los matraces se incubaron a 28 °C y 170 rpm durante 48 h en PDB y MMP, y 96 h en YPG. Pasado ese tiempo, se recogieron 100 µL de muestra a partir de la cual se realizó el recuento de microconidios.

17.4. Nivel de biomasa generado

El análisis de la biomasa generada en un medio líquido permite establecer relaciones entre la parte vegetativa y la reproductiva del hongo.

A partir del experimento anterior, una vez recogida la muestra para el recuento de microconidios, se procedió a separar el cultivo de las distintas cepas del medio de crecimiento mediante un disco de filtración (Millipore) con diámetro de poro de 0.22 µm y pesado previamente. Tras 12 horas de secado a 34 °C se pesó en una balanza de precisión LE225D Sartorius (Gotinga, Alemania).

17.5. Ensayos de crecimiento invasivo, penetración en celofán.

El ensayo de penetración en celofán (Prados-Rosales & Di Pietro, 2008) permite evaluar la capacidad que tiene el hongo para producir enzimas que degraden el celofán (polímero de celulosa) y, a su vez, la capacidad de ejercer una presión física sobre una superficie rígida.

Se prepararon placas de MMP, se cubrieron con una membrana de celofán estéril con la ayuda de unas pinzas estériles, se dejaron secar 5 min en la campana de flujo laminar y se inocularon 10 µL de 10^7 microconidios/mL en el centro de la placa incluyendo la estirpe silvestre como control. Las placas se incubaron a 28 °C

durante dos días y, pasado este tiempo, se retiró el celofán y se dejaron incubar otro día más a 28 °C. Tanto el crecimiento del hongo antes de retirar el celofán, como la penetración o no del mismo fueron documentadas mediante el escaneo de las placas.

17.6. Ensayo de toxicidad

17.6.1. Efecto de ácido fusárico y hierro.

El estudio de la posible interacción entre el hierro y el ácido fusárico se realizó un tratamiento foliar con una solución de 0,025% FeSO₄ y 0.01% tween 20 con dos repeticiones. El segundo rociado de las hojas con plantas de 15-20 días se realizó tras el secado del primer tratamiento. Para asegurar que la captación del Fe era exclusivamente vía foliar se cubrió las raíces de las plantas durante el tratamiento y tras este, se lavaron con agua destilada tres veces. cada planta de manera individual se introdujo en tubos de inóculo sumergida la raíz en 6-8 ml de soluciones 0,5 y 1 mM de ácido fusárico o solo agua destilada como control). Finalmente se realizó un seguimiento y registro de resultados de las plantas durante los días 3, 6 y 9 crecidas en condiciones óptimas.

*Lavar los tubos de inóculo con 2% HCl 30 min en agitación para eliminar trazas de iones metálicos) y aclarar 5 veces con agua destilada. Ajustar todas las soluciones a pH 6.5.

17.6.2. Toxicidad del Ácido fusárico en plantas de tomate

Para estudiar el efecto de la ausencia de hierro en el crecimiento de plantas jóvenes de tomate (15-20 días), se sumergieron las raíces en tubos de inóculo con agua destilada (6-8 mL) con o sin 300 µM ácido batofenantrolinadisulfónico sal disódica (BPS), un quelante específico de este micronutriente. Cada planta fue tratada de manera individual y mantenida en la cámara de crecimiento para ser escaneada después de 3, 6 y 9 días.

17.7. Ensayos de patogenicidad

17.7.1. Infección de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L*)

Para analizar el patotipo de las distintas cepas de *F. oxysporum*, se inocularon plantas de tomate del cultivar Monika (Syngenta seeds, Almería, España) con suspensiones de concentraciones conocidas de microconidios. (Di Pietro & Roncero, 1998). Las esporas se recogieron por filtración y posterior centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron muy bien con agua estéril desionizada y se calculó su concentración tras observarlas al microscopio con cámara de Thoma.

Las plantas de tomate, con aproximadamente 14 días tras la siembra (ver apartado 9.3), se retiraron cuidadosamente del sustrato inicial y se lavaron debajo del grifo suavemente. Seguidamente, las raíces se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión acuosa con $2 \cdot 10^6$ microconidios/mL. Transcurrido este tiempo, se trasplantó cada planta de manera individual a alveolos de siembra con nueva vermiculita y se cultivaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo y humedad relativa óptimos.

La evolución de la enfermedad se monitorizó durante 30-40 días y se estableció el índice de supervivencia.

17.7.2. Infección de larvas de la miel (*Galleria mellonella*)

Se realizó como se describe en (Navarro-Velasco, *et al* 2011). Se seleccionaron 12-15 larvas de un peso aproximado de 0,2-0,3 g y se mantuvieron en ayunas a 30 °C en botes de cristal aireados durante dos días después de la entrega con el fin de eliminar a las enfermas y evitar así sesgos en los resultados. De manera individual se inyectaron 8 µL de una suspensión de $2 \cdot 10^6$ microconidios/mL en PBS a través de la penúltima pata del animal en el espacio

intersegmental y dentro del hemocele. La inoculación se realizó con un microinyector (Burkard Auto Microapplicator de 0,1 a 10 μ L) previa desinfección superficial con alcohol antes de cada inyección. Una vez realizada la infección, las larvas fueron colocadas en frascos de vidrio con tapas agujereadas y se incubaron a 30 °C.

La supervivencia fue monitorizada cada día durante 8-10 días. Cada experimento se repitió al menos tres veces con similares resultados, en este trabajo se muestra sólo el más representativo.

18. Análisis bioinformáticos y software utilizado

18.1. Búsqueda de secuencias en base de datos

18.1.1. 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>)

18.2. Análisis del genoma NGS

18.2.1. Secuenciación

El análisis por secuenciación masiva del genoma o *Next-Generation Sequencing* (NGS) se realizó de la última población del experimento evolutivo (pasaje 10) de cada una las cinco líneas generadas (1,2,3,4,5) en las distintas condiciones, Medio mínimo (M), YPGA (Y) y Planta de tomate (P) comparadas respecto a la cepa silvestre de inicio (Tabla 13).

La preparación de la biblioteca tanto de la secuencia de referencia como de las poblaciones evolucionadas en plantas (P) y en medio rico (Y) fue realizada en las instalaciones de la Universidad de Tufts a partir de la extracción de ADN (ver apartado 10.2). Para el caso de las poblaciones en medio mínimo (M) el análisis se llevó a cabo en las instalaciones de Genomics Resource Laboratory en la Universidad de Massachusetts Amherst.

La plataforma de Illumina utilizada fue para los dos primeros casos (P) y (Y) Illumina Hi-Seq 2500 mientras que para las poblaciones (M) se usó Illumina NextSeq 500. Para confirmar si la plataforma NextSeq, más propensa a errores, introdujo algún sesgo en nuestro análisis, la población de M4-10 se volvió a secuenciar utilizando la plataforma Illumina MiSeq.

Tabla 13 Poblaciones seleccionadas para hacer el análisis por secuenciación Illumina

Muestra	Plataforma	Recuento lecturas*	Long Max lectura*	Covertura [#]	% Lecturas mapeadas ^β	GC %*																																																																																																							
WT	Illumina	28960270x	71	66	99.31	46																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					WT	PacBio RS II	117116	51882	11	98.03	46	P1-10	Illumina	36174997x	71	82	99.41	47	HiSeq 2500	2		P2-10	Illumina	42747800x	71	94	99.36	47	HiSeq 2500	2		P3-10	Illumina	38531138x	71	88	99.33	47	HiSeq 2500	2		P4-10	Illumina	37683197x	71	85	99.17	47	HiSeq 2500	2		P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47	HiSeq 2500	2		Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37
WT	PacBio RS II	117116	51882	11	98.03	46																																																																																																							
P1-10	Illumina	36174997x	71	82	99.41	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					P2-10	Illumina	42747800x	71	94	99.36	47	HiSeq 2500	2		P3-10	Illumina	38531138x	71	88	99.33	47	HiSeq 2500	2		P4-10	Illumina	37683197x	71	85	99.17	47	HiSeq 2500	2		P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47	HiSeq 2500	2		Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2														
P2-10	Illumina	42747800x	71	94	99.36	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					P3-10	Illumina	38531138x	71	88	99.33	47	HiSeq 2500	2		P4-10	Illumina	37683197x	71	85	99.17	47	HiSeq 2500	2		P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47	HiSeq 2500	2		Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																								
P3-10	Illumina	38531138x	71	88	99.33	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					P4-10	Illumina	37683197x	71	85	99.17	47	HiSeq 2500	2		P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47	HiSeq 2500	2		Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																		
P4-10	Illumina	37683197x	71	85	99.17	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47	HiSeq 2500	2		Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																												
P5-10	Illumina	39602682x	71	92	99.34	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47	HiSeq 2500	2		Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																																						
Y1-10	Illumina	29798233x	71	69	99.41	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47	HiSeq 2500	2		Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																																																
Y2-10	Illumina	41312962x	71	97	99.38	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47	HiSeq 2500	2		Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																																																										
Y3-10	Illumina	39952004x	71	94	99.44	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47	HiSeq 2500	2		Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																																																																				
Y4-10	Illumina	33929161x	71	80	99.42	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2					Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47	HiSeq 2500	2																																																																																														
Y5-10	Illumina	36560273x	71	85	99.37	47																																																																																																							
	HiSeq 2500	2																																																																																																											

Muestra	Plataforma	Recuento lecturas*	Long Max lectura*	Covertura [#]	% Lecturas mapeadas ^β	GC %*
M1-10	Illumina	43783567x	75	96	98.99	45
	NextSeq 500	2				
M2-10	Illumina	50188420x	75	108	98.88	45
	NextSeq 500	2				
M3-10	Illumina	54029793x	75	122	98.79	46
	NextSeq 500	2				
M4-10	Illumina	60497167x	75	139	99.02	47
	NextSeq 500	2				
M4-10	Illumina MiSeq	27840501X 2	75	67	99.53	47
M5-10	Illumina	59633905x	75	132	99.05	46
	NextSeq 500	2				

* Generado por FastQC v0.11.5

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)

[#] Generado por Picard CollectRawWgsMetrics y Bedtools genomecov para Pacbio reads

^β Generado por Samtools flagstat

18.2.2. Obtención de la secuencia de referencia

Para mejorar el resultado de la secuencia de referencia disponible en el NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=fusarium+oxysprum+4287>), se decidió re-secuenciar la cepa silvestre con un sistema de lecturas largas mediante la plataforma PacBio RS II en el Centro de Análisis del Genoma de Yale. El ensamblaje del genoma de novo se realizó como se describe en Ayhan, *et al* 2018 (accesión del ensamblaje: QESU00000000)

18.2.3. Alineamiento de las secuencias y diseño de la “pipeline”

El análisis bioinformático de las secuencias fue realizado en colaboración con el grupo de la profesora LiJun Ma, por Dilay Hazal Ayhan, de la Universidad de Massachussets (UMASS) en EEUU.

Las lecturas de Illumina de las poblaciones junto con las de la estirpe silvestre se mapearon en el nuevo ensamblaje (se eliminaron las secuencias repetidas) utilizando BWA mem v0.7.15 (Li & Durbin, 2009). Los alineamientos se limpiaron y clasificaron, tras lo cual la información del par se fijó, las lecturas duplicadas se marcaron y las estadísticas de alineamiento se generaron a través de Samtools v1.4.1 (Li, *et al* 2009) y Picard v2.0.1 (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Los SNPs y los pequeños INDELS se detectaron a través de GATK v3.5 HaplotypeCaller seguido de GenotypeGVCFs (McKenna, *et al* 2010) y FreeBayes v1.0.2 (Garrison & Marth, 2012); los resultados se combinaron y filtraron por calidad (> 100), profundidad de lectura (> 10) y ausencia en la estirpe silvestre. Las variantes estructurales fueron realizadas a través de GRIDSS v1.4.1 (Cameron, *et al* 2017).

Las inserciones de transposones se detectaron utilizando una “pipeline” personalizada que utiliza Samtools, Bedtools v2.26.0 (Quinlan, *et al* 2010) y Picard. Genera un archivo GFF con las ubicaciones de un único elemento transponible (TE) y un archivo de alineación de lecturas de extremo emparejado. Primero encuentra las lecturas alineadas con las ubicaciones del TE y las extrae si su par está en una secuencia diferente. Luego, las regiones de los pares son filtradas por su tamaño.

Bedtools genomecov detectó las variaciones en el número de copias en resolución de un solo nucleótido y las gráficas de cobertura sin procesar se generaron utilizando la cobertura del genoma medio en una ventana de 10 kb y normalizándola a la cobertura del genoma medio. Las parcelas de cobertura normalizadas generadas se normalizaron respecto de las coberturas brutas de la estirpe silvestre.

18.2.4. Análisis y visualización de archivos generados

A partir de los datos de generados del alineamiento de las secuencias respecto a la secuencia de referencia, se realizó un análisis exhaustivo de comprobación. Como paso previo, se visualizaron gráficamente con el programa IGV (Integrative Genomics Viewer) los archivos BAM y GFF para diferenciar variaciones en las secuencias, así como en la cobertura de lecturas asociadas a una zona determinada.

18.2.5. Otras manipulaciones de secuencias

La manipulación de las secuencias descargadas a partir de las cuales se realizó el diseño experimental se realizó con SnapGene, este software permite encontrar posibles sitios de corte de enzimas de restricción en la secuencia. En los casos donde los cambios encontrados en la secuencia permitían su detección polimórfica en un gel de agarosa se decidió diseñar una pareja de oligonucleótidos flanqueantes al evento de estudio con el programa de diseño Oligo 7.

18.3. Análisis estadístico

El estudio estadístico de los ensayos fenotípicos fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) según un diseño experimental al azar. En todos los casos, los valores de estos parámetros cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para este análisis. Las medias de los ensayos se compararon de acuerdo con la prueba de HSD de Tukey a $P = 0,05$ y de acuerdo con la prueba de Dunnett (* $P = 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$). Los datos se analizaron con Statistix 10.0® (Analytical Software, 2013).

Para el análisis de la supervivencia en los ensayos de infección de plantas y *Galleria* se compararon los grupos con el método Kaplan-Meier y el test log-

rank (utilizando el programa estadístico GraphPad Prism). Se consideró que los grupos eran estadísticamente diferentes cuando el P-valor fue < 0,05, tal y como ha sido descrito en (López-Berges, *et al* 2012)

18.4. Programas informáticos

Para el procesamiento y manejo de los datos obtenidos en este trabajo se han utilizado los programas informáticos y páginas webs que se detallan en la Tabla14

Tabla 14. Programas informáticos usados para el análisis de datos en este trabajo.

Programa	Aplicación
BLAST (NCBI)	Búsqueda de secuencias
CFX Maestro (Bio Rad)	Obtención y análisis de datos de datos de qPCR
Adobe photoshop CS3	Edición de imágenes
GraphPad Prism 6	Elaboración de gráficos
Image J	Edición de imágenes
Kodak 1D Image Análisis	Captura de imágenes fotográficas de geles de agarosa
Leica IM500 V1.2	Edición de imágenes de microscopio y lupa
Oligo 7	Diseño y análisis de oligonucleótidos
SnapGene	Edición y análisis de secuencias nucleotídicas o proteicas
Image Reader LAS-3000	Captura, edición y análisis de imágenes obtenidas tras revelado mediante detección quimioluminiscente
Multi Gauge V3.0	Cuantificación y medición de imágenes

Resultados: Capitulo 1

19. Introducción

F. oxysporum es un patógeno de suelo ubicuo, que está sometido a diversos estreses tanto bióticos como abióticos en continuo cambio en la naturaleza. Actualmente se desconoce la base genética que condiciona su supervivencia o el papel que pudieran jugar, por ejemplo, las mutaciones espontáneas en la adaptación ambiental. A priori parece lógico pensar que algunas de estas mutaciones puedan conferir al patógeno una ventaja selectiva, ya sea desde un punto de vista de la supervivencia o competitividad con otros microorganismos, e incluso en su mismo desarrollo a través de una mejora fenotípica.

Estudios previos en nuestro grupo han demostrado, que la cepa Fol 4287 puede generar sectores con crecimiento distinto al de la cepa original de forma espontánea, a partir de colonias en distintos tipos de medios (Pérez-Nadales et al., sin publicar). Estos sectores fueron fácilmente diferenciables, debido a un crecimiento más rápido (variantes de crecimiento) respecto al resto de la colonia. El aislamiento y posterior re-secuenciación de estos sectores reveló que parecen contener deleciones y duplicaciones largas que afectan segmentos cromosómicos, aunque se desconocen las consecuencias fenotípicas derivadas de estas mutaciones.

En el primer paso del presente trabajo hemos tratado de confirmar y profundizar los resultados previos, a través de la cuantificación de las variantes de crecimiento surgidas de manera espontánea en distintas cepas de nuestra colección de *F. oxysporum*. Además, hemos procedido al re-aislamiento de nuevas variantes de crecimiento surgidas en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

19.1. Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) en colonias de *F. oxysporum*.

El crecimiento diferenciado en forma de sector es un fenómeno observado en numerosas ocasiones en la cepa Fol 4287, utilizada en este estudio. Aunque la capacidad de producir sectores de colonia es un fenómeno observado con frecuencia en hongos, las bases genéticas y sus consecuencias fenotípicas permanecen en gran parte desconocidas. Por esta razón el primer objetivo de este trabajo ha sido monitorizar en detalle este fenómeno a través de la cuantificación de los sectores espontáneos por colonia. Para ello se diseñó un experimento que permitiera el análisis de múltiples colonias a la vez en un espacio reducido. Se probaron varios suplementos en medio mínimo Puhalla, de los que finalmente se seleccionó el AA metionina a una concentración de 50 mM.

El estudio de la frecuencia de variantes de crecimiento, denominadas así por su mayor velocidad de crecimiento en forma de sector, se realizó con dos objetivos distintos. El primero, distinguir la capacidad o no de producir sectores de distintas cepas de *F. oxysporum* pertenecientes a distintas "*formae speciales*" disponibles en la colección del grupo. El segundo objetivo fue determinar si existen mutaciones concretas que eliminan la capacidad de producir sectores, a través del estudio de mutantes nulos obtenidos en el fondo genético de la cepa Fol 4287 (f. sp. *lycopersici*).

El análisis del número de sectores identificados por colonia en las distintas *formae speciales* (Figura 13) reveló que algunas de ellas no formaron sectores identificables en el medio utilizado. Este fue el caso de las cepas 54008 y 699 (f. sp. *conglutinans-crucíferas*); 26381 (f. sp. *radicis-lycopersici-tomate*); y 37622 (f. sp. *pisi-guisante*). El resto de las cepas analizadas si producían sectores, aunque se puede distinguir a un grupo de baja frecuencia con valores entre 0,2-0,6 sectores por colonias donde están 54004 (f. sp. *raphani-crucíferas*), 54006 (f. sp.

cubense -plátano) y 26406 (f. sp. *melonis*-melón) y a otro grupo de alta frecuencia con niveles que oscilan entre 1,6-3,2 sectores por colonia donde están la cepa utilizada en este estudio 4287 (f. sp. *lycopersici*-tomate), 54003 (f. sp. *lycopersici* raza 3), 54002 (no patógena) y 32931 (aislado de humano), siendo esta última la cepa donde mayor número de sectores por colonia se contabilizaron.

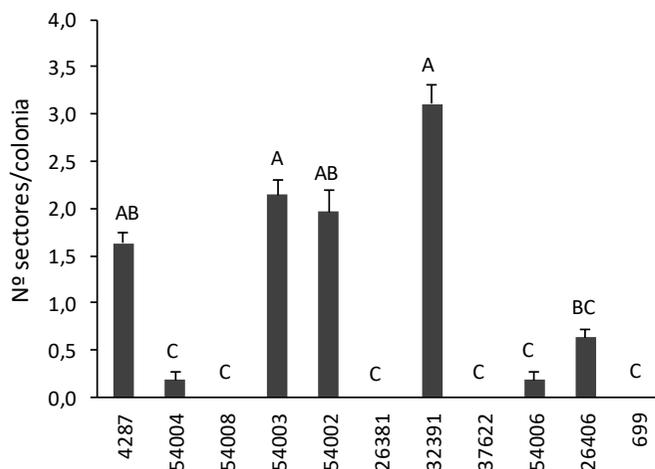


Figura 13. Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) observados en colonias de distintos aislados de *F. oxysporum*. Número medio de sectores por colonia de los aislados indicados, crecidos en medio mínimo con 50 mM metionina como única fuente de nitrógeno. Los valores indicados representan la media de 27 colonias. Los valores con la misma letra no difieren de manera significativa según el ensayo ANOVA y el análisis comparativo LSD ($P < 0,05$). Aislados: 4287 (f. sp. *lycopersici*-tomate); 54004 (f. sp. *raphani*-crucíferas); 54008 (f. sp. *conglutinans*-crucíferas); 54003 (f. sp. *lycopersici* raza 3); 54002 (no patógena); 26381 (f. sp. *radicis*-*lycopersici*-tomate); 32931 (aislado de humano); 37622 (f. sp. *psi*-guisante); 54006 (f. sp. *cubense*-plátano); 26406 (f. sp. *melonis*-melón); 699 (f. sp. *conglutinans*-crucíferas).

En el segundo estudio con distintos mutantes nulos de la cepa silvestre de Fol 4287 (wt) (Figura 14) se observaron diferencias en el número de sectores contabilizados por colonia. Se identificaron tres grupos: uno con frecuencias muy similares a la registrada en la cepa original $\Delta fgb1$ (codifica para la subunidad Beta de una proteína G que funciona aguas arriba de la ruta del AMPc), $\Delta fso1$ (proteína del dominio WW implicada en la fusión hifal), $\Delta noxR$ (pertenece al complejo NOX, NADPH, oxidasa que regula la síntesis del peróxido de hidrógeno), $\Delta noxB$

(pertenece al complejo NOX, NADPH, oxidasa que regula la síntesis del peróxido de hidrogeno) y *Δste12* (factor de transcripción relacionado con la ruta MAPK), lo que indica que estas mutaciones no afectan la capacidad de producir sectores. El segundo grupo muestra una frecuencia más baja que wt *Δatg8* (proteína de tipo ubiquitina, necesaria para la formación de membranas autofagosómicas), *ΔnoxA* (pertenece al complejo NOX, NADPH, oxidasa que regula la síntesis del peróxido de hidrogeno) , *ΔmodA* (proteína GTPasa involucrada en la polaridad de las células hifales), *Δvea* (proteína del complejo velvet relacionada con el metabolismo secundario), *Δbmh1* (proteína 14-3-3 reguladora de múltiples procesos biológicos), *Δfmk1* (proteína quinasa ,MAPK, no patógeno en plantas de tomate), es decir estas mutaciones reducen la capacidad de producir sectores. Y finalmente un grupo con frecuencias más altas, *Δlae* (codifican a un regulador global del metabolismo secundario) y *Δfbp1* (proteína componente del complejo de ligasa E3 de SCF, es esencial para el crecimiento invasivo y la virulencia) respectivamente, indicando que estas mutaciones incrementan la capacidad de producir sectores de manera espontánea.

El aspecto de los sectores observados fue diverso, registrándose varios fenotipos diferenciados al compararlos con el crecimiento del wt en esa condición. Los más comunes fueron con aspecto algodonoso que incluye mayor crecimiento aéreo, crecimiento radial con aspecto de abanico que podían ser a su vez mas o menos rápidos o tupidos, y crecimiento con ramificaciones gruesas fácilmente distinguibles.

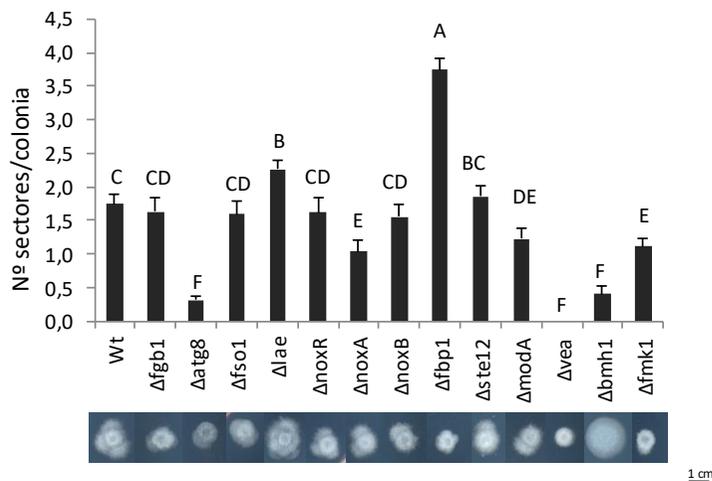


Figura 14. Frecuencia de sectores (variantes de crecimiento) observados en colonias de la cepa silvestre 4287 (wt) y de distintos mutantes nulos de la misma. (Arriba). Número medio de sectores por colonia de los aislados indicados, crecidos en medio mínimo con 50 mM metionina como única fuente de nitrógeno. Los valores indicados representan la media de 27 colonias. Los valores con la misma letra no difieren de manera significativa según el ensayo ANOVA y el análisis comparativo LSD ($P < 0,05$). (Abajo) Imágenes representativas de los sectores.

19.2. Aislamiento de variantes espontáneas de crecimiento.

La diferencia de fenotipo de los sectores no solo permite contabilizarlos, también facilita su aislamiento a partir de la colonia. De este modo se pueden estudiar de forma independiente otros cambios de fenotipo respecto a la cepa original. Para la generación de variantes espontáneas se creció la cepa wt en Medio Mínimo Puhalla (MMP) con distintas fuentes de nitrógeno durante 7 días.

En la mayoría de las placas (6 repeticiones por condición) se observaron crecimientos diferenciados sectoriales en la colonia a partir del día 6. En total se aislaron 38 variantes de crecimiento en las distintas fuentes de nitrógeno: 10 aislados en nitrato, 5 aislados Ac glutámico, 8 aislados en glutamina, 6 aislados en hidroxurea, 5 aislados en urea, 1 aislado en metionina y 3 aislados en sulfato de amonio. La identificación por fenotipos diferenciados respecto a wt se realizó con cada una de las distintas variantes de crecimiento, en tres medios distintos: PDA,

MMP + Ac. glutámico y MMP + metionina. Se registraron como diferentes respecto a wt 29 de los 38 aislados de inicio, repartidos en 11 fenotipos distintos (Figura 15.A). La distribución de los distintos fenotipos según la fuente de nitrógeno presente en el medio permitió identificar algunos casos donde un mismo fenotipo había sido aislado de distintos medios (Figura 15.B). Este es el caso, por ejemplo, de los fenotipos F1 y F4 o de F2, encontrados en 4 y 3 medios de origen diferentes respectivamente. Los demás fenotipos descritos sólo se aislaron a partir de un solo tipo de medio.

En cuanto al fenotipo más abundante, F1 fue el más repetido (8 veces), seguido de F2 y F6 (6 veces) y en menor frecuencia F3, con 2 veces. Los demás fenotipos solo se identificaron 1 sola vez en una fuente de nitrógeno concreta.

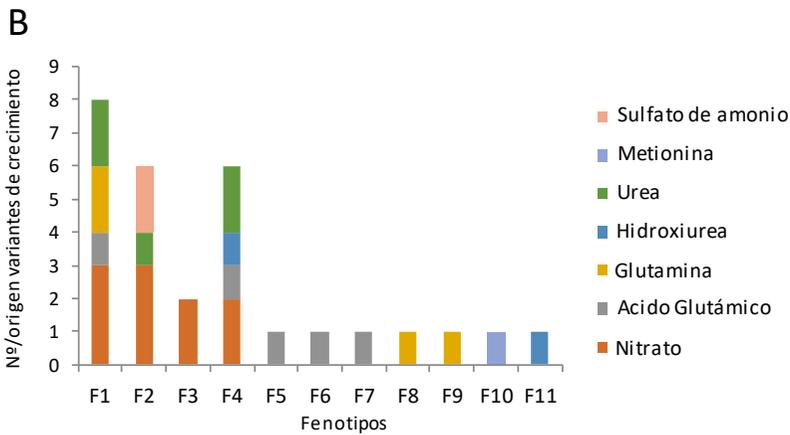
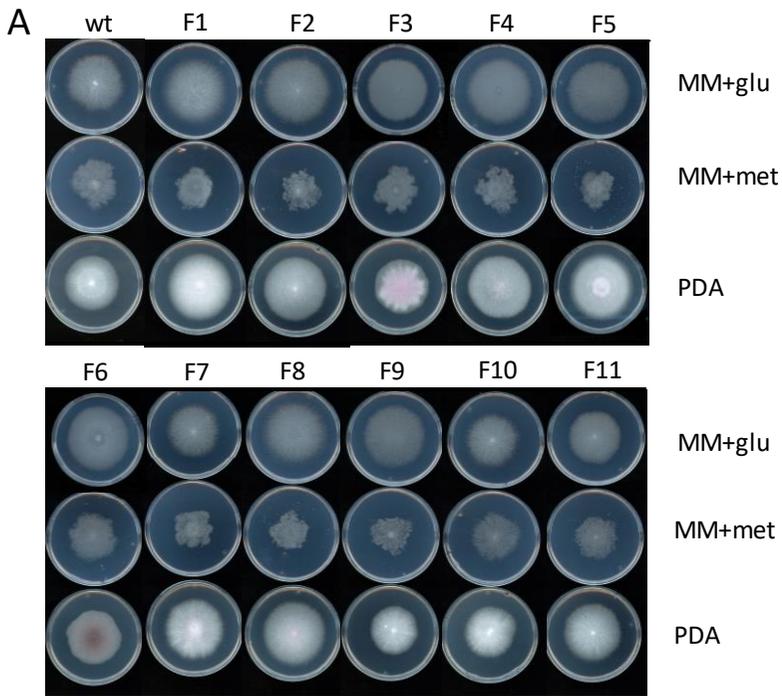


Figura 15. Fenotipo de colonia de distintas variantes de crecimiento, aisladas a partir de la cepa silvestre crecida en Medio Mínimo Puhalla con distintas fuentes de nitrógeno. (A) Aislados monospóricos de los sectores se inocularon en los medios MM + Ac glutámico, MM + metionina y PDA. Se muestran los fenotipos diferenciales (F1-F11), considerados como representativos. (B) Número total de sectores asignados a cada fenotipo. Los colores indican el medio a partir del cual se aislaron los sectores.

19.3. Caracterización fenotípica de las variantes espontáneas de crecimiento.

Una vez identificadas las variantes de crecimiento y con el fin de investigar si las previsibles mutaciones habían producido cambios en determinadas características fenotípicas de interés, se llevó a cabo un estudio con diferentes ensayos: estrés de pared, estrés de temperatura alta, conidiación, velocidad de crecimiento y penetración de celofán, que permitieran observar cambios en las variantes aisladas, todas ellas obtenidas a partir del mismo origen genético (wt).

19.3.1. Algunas variantes de crecimiento muestran mayor sensibilidad al estrés de pared y de temperatura.

Para investigar si los cambios producidos afectan la integridad celular de las variantes, se evaluó el crecimiento en medio completo YPGA suplementado con Calcoflúor white (CFW, 40 µg/mL), que se une a la quitina de la pared celular (Figura 16).

Se observó una mayor sensibilidad de F6 al medio que contenía CFW. Otros fenotipos, como F1, F3 y F10, mostraron un ligero incremento de la sensibilidad detectada en la última dilución de microconidios con una concentración de $5 \cdot 10^2$. Para el resto de aislados no se observaron diferencias.

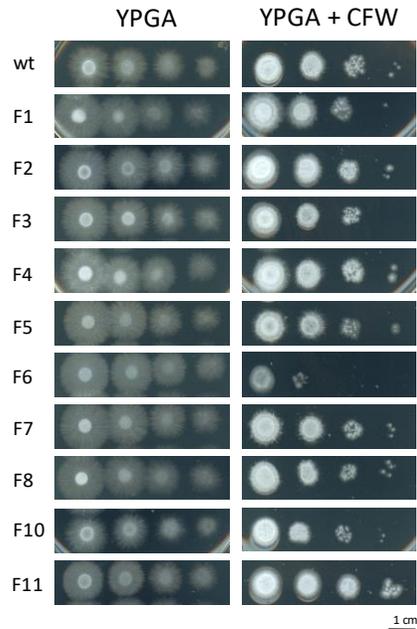


Figura 16. Sensibilidad de los distintos fenotipos de variantes de crecimiento a estrés de pared Crecimiento de cepas representativas de cada uno de los tipos de variantes indicados en medio YPGA, en ausencia o presencia de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Calcofluor White (CFW). Se inocularon $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^2$ esporas totales y se incubaron durante 3 días a 28°C. La barra de escala equivale a 1 cm.

A continuación, se evaluó el crecimiento de las variantes aisladas en medio completo YPGA a 28°C (control) y 34 °C (temperatura alta). Los fenotipos F6 y F11 crecieron de una manera más restringida resultando ser menos resistentes al estrés térmico de 34°C que el wt. (Figura 17). El resto de aislados no mostraron diferencias detectables.

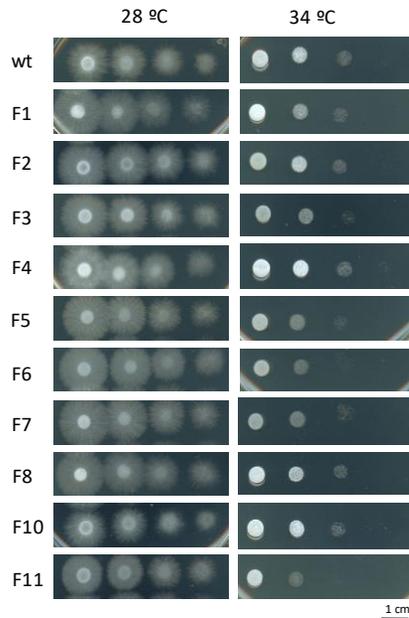


Figura 17. Sensibilidad de los distintos tipos de variantes de crecimiento al estrés de temperatura alta. Crecimiento de las cepas representativas de cada uno de los tipos de variantes indicados en medio YPGA con incubación a 28 y 34°C. Se inocularon $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^2$ microconidios totales y se incubaron durante 3 días.

19.3.2. La mayoría de las variantes crecen más rápido que el wt y muestran diferencias en el nivel de conidiación.

Se estudió la velocidad de crecimiento de los 11 fenotipos seleccionados, calculado según el incremento del área de la colonia durante dos días seguidos (D3-D2) en dos medios distintos, PDA y MMP. Como puede verse en la figura 19, en general todos los aislados mostraron ser más rápidos que wt en ambos medios de cultivo. Este resultado no sorprende debido a que el rasgo diferenciador por el cual fueron aislados fue precisamente un crecimiento más rápido respecto a la colonia de donde surgieron. Aun así, dos de ellas, F5 y F10 en PDA (Figura 18.A) junto con otras dos F3 y F8 en medio MM (Figura 18.B) no mostraron diferencias significativas con la cepa wt. Sorprende el resultado obtenido en F9 para el medio PDA y F10 para el medio MM, cuyo crecimiento fue inferior al de la cepa wt.

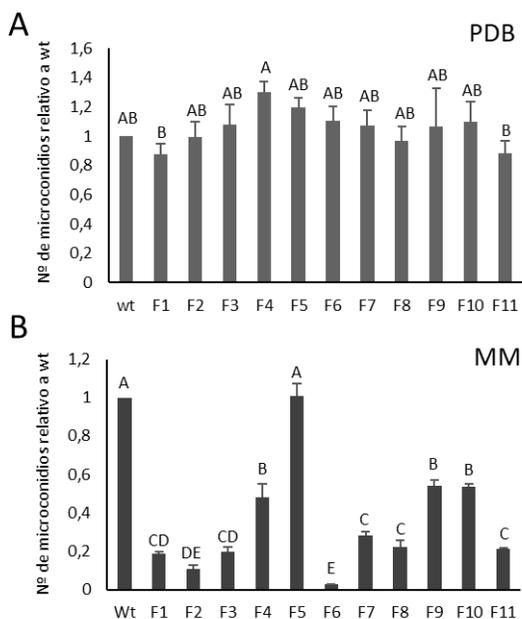


Figura 18. Velocidad de crecimiento de las distintas variantes. Incremento (Δ) del área de la colonia, calculado como la diferencia entre los días 2 y 3. Se inoculó una gota con 10^6 microconidios en el centro de una placa Petri con medio PDA (**A**) o MM (**B**). La media y el error estándar se calcularon a partir de 4 réplicas biológicas. Los valores con la misma letra no muestran diferencias significativas según el test de LSD ($P \leq 0,05$).

La capacidad de producir microconidios en medio líquido se cuantificó nuevamente en los dos medios PDB y MM. De esta manera podíamos estudiar el comportamiento fenotípico de un aspecto tan importante como es la conidiación en dos medios muy distintos. En general el medio considerado como rico, PDB, no mostró diferencias significativas para la mayoría de las variantes fenotípicas analizadas, con dos excepciones (Figura 19.A). Por un lado, los aislados F1 y F11 produjeron en torno a un 5-10% menos conidios que la cepa silvestre según la media de las tres replicas biológicas, mientras que F4 aumentó la capacidad de conidiación alrededor de un 25 %. Si nos fijamos en el resultado de la condición de MM, se observan diferencias claras entre las 11 variantes de crecimiento (Figura 19.B). La mayoría mostró una importante reducción de la conidiación por

debajo del 50% respecto al wt, excepto para F5 que no fue significativamente distinto a la cepa silvestre.

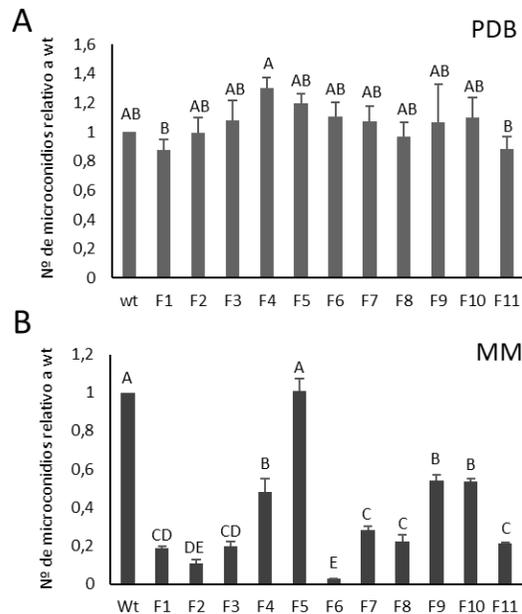


Figura 19. Producción de microconidios en los distintos tipos de variantes. (A,B) Producción de microconidios en medio líquido PDB tras 2 días de incubación **(A)** o medio mínimo Puhalla tras 7 días de incubación **(B)**, a 28°C y con una agitación de 170 rpm . Se inocularon $5 \cdot 10^6$ microconidios/mL. Tras el periodo de incubación se contaron los microconidios producidos y se calculó el número relativo frente a wt. La media y el error estándar se calcularon a partir de 3 réplicas biológicas. Los valores con la misma letra no muestran diferencias significativas según el test de LSD ($P \leq 0,05$).

19.3.3. Las distintas variantes muestran cambios en el crecimiento invasivo.

Para determinar el crecimiento invasivo de las distintas variantes, se analizó la capacidad de penetración de una membrana de celofán en dos medios distintos, PDA (Figura 20.A) y MM (Figura 20.B), ambos sin tamponar. En estas condiciones la cepa silvestre fue capaz de traspasar el celofán, mientras se observó una reducción en el crecimiento invasor de algunas de las variantes. Concretamente en el medio PDA las variantes F1, F4 y F5 perdieron la capacidad

de traspasar el celofán, mientras que F7 y F8 mostraron una notable reducción. En MM, F1 y F5 se comportaron del mismo modo que en PDA, mientras que F4, F7 y F8 recuperaron la capacidad de atravesar el celofán. Del mismo modo hubo otros aislados que se comportaron de manera diferente según el medio, este fue el caso de las variantes F1, F4, F5 que fueron capaces de traspasar el celofán en PDA pero no en medio mínimo.

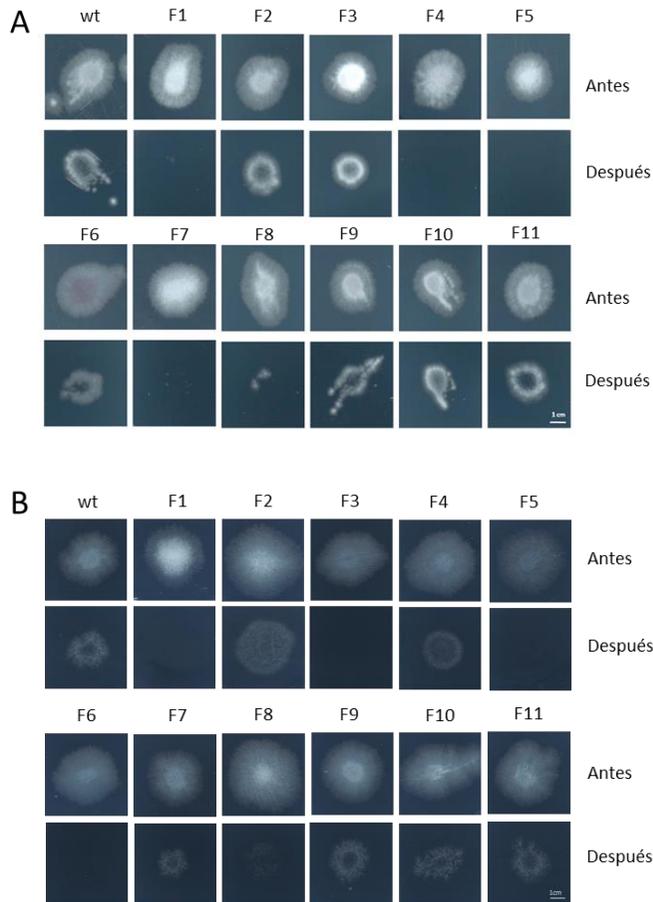


Figura 20. Capacidad de penetración de membranas de celofán de los distintos tipos variantes. Se inocularon $5 \cdot 10^4$ microconidios en una placa de medio PDA (A) o MM (B) cubierta con una membrana de celofán y se incubaron a 28°C (antes). Tras 2 (PDA) o 3 (MM) días, el celofán con la colonia fúngica fue retirado y las placas fueron incubadas 1 día más a la misma temperatura para visualizar la presencia de micelio que había penetrado a través del celofán (después). La barra de escala equivale a 1 cm.

19.3.4. Ensayos de patogenicidad

Con el fin de estudiar los posibles cambios en la virulencia, se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate con la estirpe silvestre y con cinco variantes de crecimiento F1, F4, F5, F6, F11 seleccionadas en base a las características evidenciadas en los ensayos anteriores. También se incluyó como controles negativos un mutante nulo $\Delta fmk1$ incapaz de causar enfermedad (Di Pietro et al. 2001) y el control de agua. En la figura 21.A se muestra la supervivencia de las plantas infectadas durante 25 días. En general todas las variantes de crecimiento ensayadas fueron más rápidas en el desarrollo de la enfermedad comparadas con la cepa silvestre. Según el análisis estadístico, las diferencias entre F1 ($P=0,0203$), F4 ($P=0,016$), F6 ($P=0,362$) y F11 ($P=0,444$) y la cepa silvestre, respectivamente, fueron significativas mientras que la variante F5 no fue significativamente distinta ($P=0,0541$).

El estudio no estaría completo sin el análisis de virulencia de las distintas variantes F1, F4, F5, F6, F11 en un huésped animal (*Galleria mellonella*). Como puede observarse en la figura 21.B la cepa silvestre wt infecta y mata a las larvas de *G. mellonella* en 3 días. Las variantes F5 y F11 causaron una mortalidad significativamente reducida comparado con la cepa wt ($P=0.0014$ y $P=0.011$, respectivamente), con un desarrollo de la enfermedad más lento que llegó hasta los 7-8 días. El resto de las variantes no mostró diferencias en la infección frente a la cepa wt.

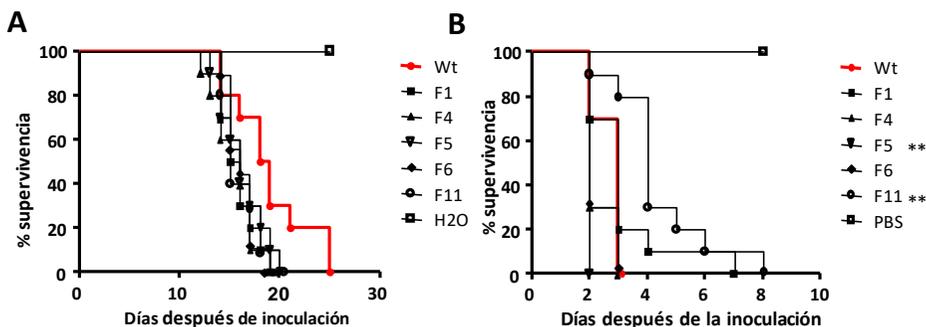


Figura 21. Virulencia de algunos tipos de variantes en plantas de tomate y en larvas de la miel (*Galleria mellonella*). (A) Grupos de 10 plantas de tomate (cultivar Mónica) se inocularon con $2 \cdot 10^6$ microconidios/mL de las distintas variantes de crecimiento de *F. oxysporum*. (B) Grupos de 15 larvas fueron inoculadas individualmente con $1.6 \cdot 10^4$ microconidios totales mediante un microinyector. Como control se utilizó la cepa silvestre (wt) y larvas inoculadas con solución salina sin microconidios (PBS). Se muestra el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo en un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. El análisis estadístico se realizó según el test Log-Rank (Mantel-Cox) donde *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$ respectivamente.

19.4. El análisis cromosómico revela reorganizaciones en algunas variantes de crecimiento.

Para estudiar posibles cambios genéticos a gran escala, se determinó el cariotipo de aquellas variantes de crecimiento con más cambios fenotípicos en los ensayos anteriormente descritos. Se obtuvieron protoplastos de F1, F4, F5, F6 y F11 de las que se aisló el ADN cromosómico intacto con el que se realizó una electroforesis de campo pulsante (CHEF) que separa los distintos cromosomas por tamaño.

A la derecha de la figura 22 se muestra un esquema, presentado como hipótesis, de la disposición de los distintos cromosomas en la electroforesis según la predicción de tamaño a partir del más reciente proyecto de secuenciación de la cepa Fol 4287 (Ayhan, *et al* 2018). En rojo se indica la posición deducida a partir

de una hibridación Southern blot con una sonda específica de los cromosomas 3 y 6 (Gómez Gil, sin publicar) y 14 (Bravo Ruiz, sin publicar).

En las variantes F4 y F6 no se observó la banda correspondiente al cromosoma 15, mientras que en F5, F6 y F11 se detectaron posibles cambios de tamaño en los cromosomas 14, 12 y 13 (flechas rojas). En las variantes de crecimiento F6 y F11 se observaron bandas que no correspondían a ningún tamaño de cromosomas conocido (4,6 kb y 0,6 kb) (flechas blancas)

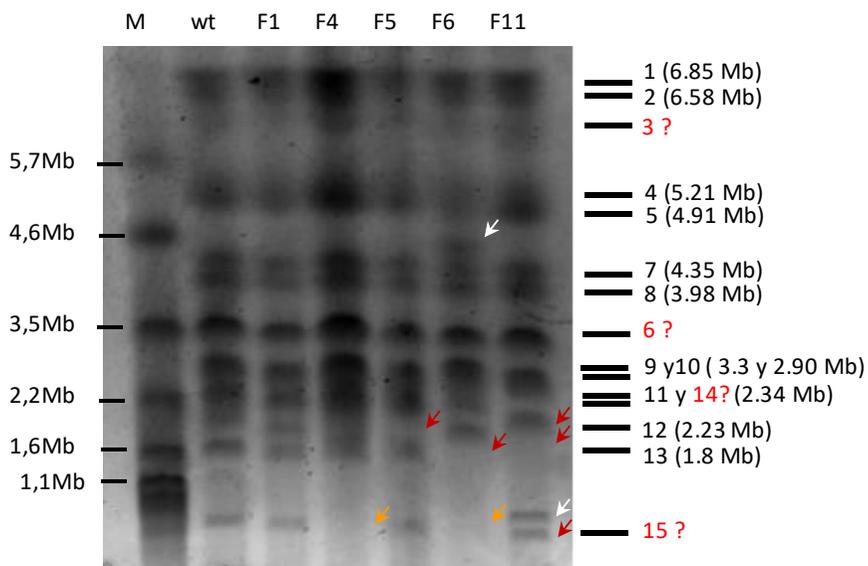


Figura 22. Cariotipo de cepas representativas de algunos de los tipos de variantes de crecimiento obtenidas a partir de la cepa silvestre de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* Fol4287. Separación de cromosomas de las cepas indicadas mediante electroforesis en campo pulsante (CHEF). El carril de la izquierda (M) muestra la mezcla de los cromosomas de *S. pombe* y *S. cerevisiae*, utilizados como marcadores de peso molecular conocido (ver tamaños indicados). A la derecha se indican los supuestos números de cromosomas asociados a las bandas obtenidas, según los tamaños determinados en el análisis más reciente de secuenciación (Ayhan, et al 2018). En las variantes F4 y F6 no se observa la banda correspondiente al cromosoma más pequeño (posiblemente cromosoma 15) (flechas naranjas). En las variantes F5, F6 y F11 se observan cambios de tamaño, posiblemente asociados a los cromosomas 14, 12 y 13 (flechas rojas). En las variantes de crecimiento F6 y F11 se observan bandas nuevas que no correspondía a ningún tamaño de cromosomas del wt (4,6 kb y 0,6 kb) (flechas blancas).

Resultados: Capitulo 2

20. Introducción

El análisis previo de las variantes de crecimiento nos permitió encontrar nuevos fenotipos, algunos de ellos asociados a reorganizaciones cromosómicas, en los aislados obtenidos a partir de la cepa silvestre original. Esto nos llevó a proponer que se producen, de manera espontánea, cambios en el genoma de *F. oxysporum* que afectan, en este caso, la velocidad de crecimiento, rasgo por el cual fueron identificados. Sabemos que, a pesar de carecer de ciclo sexual conocido, *F. oxysporum* tiene gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. Sin embargo, se desconoce cuáles son los mecanismos asociados a esta variabilidad. En este punto surgen preguntas sobre la naturaleza de las mutaciones que pudieran estar relacionadas con la adaptación, además de la dinámica en la frecuencia de las mutaciones a lo largo del tiempo o la repetibilidad de la trayectoria de las mutaciones acumuladas dentro de cada población.

Estudios similares con microorganismos y virus han revelado que las tasas de mutación beneficiosas son lo suficientemente grandes como para que las mutaciones múltiples se propaguen simultáneamente, un efecto conocido como "interferencia clonal". Esto significa que el destino de cada mutación depende no solo de su propio efecto sobre el fenotipo, sino también del resto de la variación genética presente en la población. Este es el caso, por ejemplo, de un estudio reciente realizado con *S. cerevisiae* donde se analizaron poblaciones de levadura con tamaño grande (10^6) o pequeño (10^5) durante 1000 generaciones de crecimiento en un medio rico. Los resultados pusieron de manifiesto por primera vez, que las mutaciones rara vez son únicas, sino que más bien se mueven a través de las poblaciones como agrupaciones "compañeras" temporales de mutaciones, aunque no tienen por qué estar relacionadas funcionalmente (Lang, *et al* 2013).

En este objetivo se intentó dar explicación precisamente a la relación entre los cambios genéticos seleccionados en un microorganismo más complejo, como es *F. oxysporum*, y su relación con la adaptación a una condición ambiental determinada. Para ello se creció la cepa silvestre Fol 4287 en tres condiciones ambientales distintas: infección de plantas de tomate (P), crecimiento en placa sobre medio mínimo (MM) y medio completo (YPGA). Se realizaron cinco líneas independientes con 10 pasajes seriados cada una. Con el objetivo de rastrear e identificar las mutaciones en las poblaciones evolucionadas, se realizó una secuenciación del genoma completo de la última población generada (nº 10), comparando el resultado con la cepa original. Posteriormente se estudió la dinámica evolutiva de algunos eventos a lo largo del todo el experimento.

20.1. Diseño de los experimentos de evolución adaptativa

Se decidió utilizar un diseño de evolución adaptativa por transferencia seriada, donde se utiliza una parte de la población generada como inicio del siguiente pasaje. Se utilizaron tres condiciones ambientales distintas, la infección de plantas de tomate (P), el huésped principal del patógeno; así como el crecimiento y esporulación en cultivo sólido sobre medio mínimo (M) o medio completo (Y). Se generaron 5 líneas independientes por cada condición, en total 15 poblaciones evolucionadas a través de 10 pasajes seriados. Esto supone un total de 150 poblaciones intermedias que fueron conservadas en condiciones de ultracongelación (-80 °C). Dichas poblaciones han servido de base para el estudio molecular de la dinámica del proceso de evolución experimental (Figura 23).

Respecto al experimento de evolución sobre plantas de tomate se decidió utilizar el protocolo de inoculación estándar (Di Pietro & Roncero, 1998) donde la raíz de las plantas de tomate de 14 días, se sumergieron en una suspensión de microconidios durante 30 min. Con el objetivo de seleccionar líneas evolucionadas para colonizar la planta vía xilemática, se volvió a aislar el hongo

del sistema vascular del tallo, con preferencia de la zona apical cerca de las hojas, mediante desinfección superficial y transferencia a placas de PDA. El tiempo establecido como óptimo para el aislamiento fue de 12-14 días tras la infección, coincidiendo con los primeros síntomas de enfermedad en las plantas, caracterizadas por un amarilleamiento, sin necrosis, de los cotiledones y de la primera hoja verdadera, Para confirmar que los síntomas observados no se debían a otras razones ajenas a la infección se incluyó de manera rutinaria un control de agua sin microconidios, en el cual se realizó el mismo seguimiento de los síntomas que en las plantas inoculadas. Durante la realización de los diez pasajes por la planta no se observaron variaciones en los síntomas de enfermedad, salvo en los pasajes 7 y 8 donde se detectó un ligero adelanto en los síntomas en las plantas de tomate.

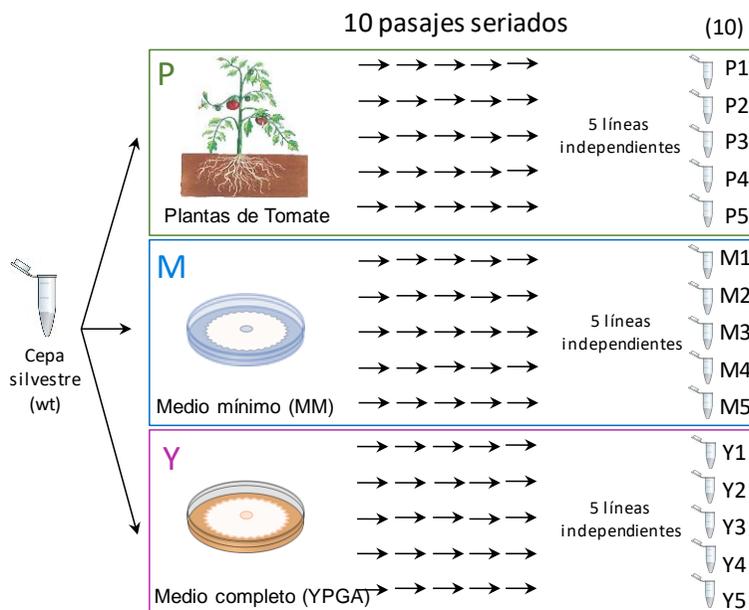


Figura 23. Esquema general del experimento de evolución experimental. A partir de la línea clonal de la cepa silvestre (wt) se realizaron 10 pasajes seriados en tres condiciones distintas: infección de raíces de plantas de tomate (P, verde); placas de medio mínimo (M, azul) y placas de medio completo YPGA (Y, morado). En cada condición se realizaron cinco líneas independientes (1-5). Las líneas obtenidas tras el pasaje 10 se analizaron por

secuenciación masiva del genoma o *Next-Generation Sequencing* (NGS) y se compararon con la secuencia genómica de la cepa wt.

En los pasajes por la planta se intentó tratar de evitar cualquier interferencia propia de los medios de cultivo, fue necesario tras el reislamiento del hongo del sistema vascular, incluir en el diseño experimental un breve paso (36 horas) de cultivo en medio PDB líquido para poder, por un lado, mantener el mismo número de microconidios en el siguiente paso de inoculación y por otro, poder almacenar una muestra representativa de cada pasaje.

En segundo experimento de evolución adaptativa se realizó en placas de medio mínimo (MMP) y medio completo (YPGA), en ambos casos se utilizó el mismo procedimiento experimental. En el centro de la placa Petri se inoculó una gota con 10^7 microconidios y se dejó crecer la colonia durante siete días hasta alcanzar el borde de la placa, antes de recoger la siguiente generación de conidios. El recuento de los microconidios totales recogidos a partir de la placa permitió establecer que el cuello de botella en cada pasaje en torno al 5 % de la población en todas las líneas, excepto para Y1 en la que estuvo en torno al 2,5 %. En cuanto al fenotipo de crecimiento de la colonia, en el caso de las líneas evolucionadas en medio mínimo no se observaron cambios aparentes. Por el contrario, en las líneas evolucionadas en medio completo si se observó una diferencia clara en el fenotipo de la línea Y1 respecto a las otras cuatro líneas Y2, Y3, Y4 e Y5, tanto por el color de la colonia, como por el número de microconidios recogidos. La colonia de Y1 mostro un color blanco homogéneo frente al color rosáceo por zonas dispersas, observado en el resto de las líneas. La diferencia se detectó tras el primer pasaje, y se mantuvo durante todo el experimento de evolución. Además, el número de microconidios recogidos en Y1 fue aproximadamente el doble respecto al resto de líneas.

Como primer paso se llevó a cabo un análisis fenotípico del ultimo pasaje (10) de cada una de las 15 líneas.

20.2. Análisis fenotípicos de las poblaciones evolucionadas tras el pasaje 10.

Para determinar si las mutaciones generadas a lo largo de los distintos experimentos de evolución habían provocado cambios en la virulencia del patógeno se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate, con las 15 poblaciones obtenidas tras el pasaje 10, es decir, P1-10, P2-10, P3-10, P4-10 y P5-10 (plantas), M1-10, M2-10, M3-10, M4-10 y M5-10 (medio pobre), e Y1-10, Y2-10, Y3-10, Y4-10 e Y5-10 (medio completo). Todas ellas se compararon con la cepa silvestre wt (Figura 24). Las raíces de plántulas de tomate se inocularon en una suspensión con $2 \cdot 10^6$ microconidios/mL, una concentración 2,5 veces menor que la usada en la evolución experimental. Esto permitió alargar en torno a una semana el proceso de enfermedad, obteniendo así una mejor resolución de las diferencias en la virulencia de las poblaciones comparado con el wt. Se monitorizó el porcentaje de supervivencia hasta 40 días post-infección (López-Berges, *et al* 2012). Para las cinco poblaciones evolucionadas en plantas de tomate no se observaron diferencias significativas al compararlas con el wt, ya que, en casi todos los casos, la mortalidad fue del 100 % transcurridos 30 días (Figura 24.A). Por otra parte, sí se encontraron diferencias para algunas de las poblaciones evolucionadas en placas. Concretamente, las poblaciones M1-10 y M4-10 causaron significativamente menos mortalidad que la cepa wt ($P < 0,0001$ y $P = 0,0017$), con un 90 % y 40 % de plantas vivas tras 40 días de infección respectivamente (Figura 24.B). Por otro lado, las poblaciones Y2-10, Y3-10, Y4-10 e Y5-10 mostraron ser significativamente menos virulentas ($P < 0,0001$, $P = 0,0084$, $P < 0,0001$, $P = 0,0077$) al compararlas con el wt (Figura 24.C).

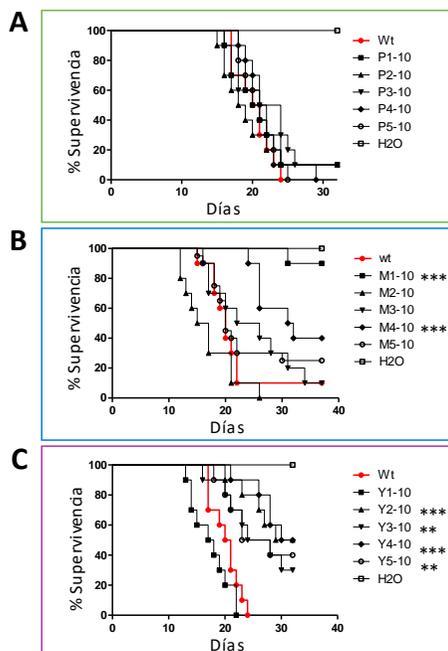


Figura 24. Virulencia en tomate de las poblaciones obtenidas tras la evolución experimental. Grupos de 10 plantas de tomate (cultivar Mónica) se inocularon con $2 \cdot 10^6$ microconidios/ml de las poblaciones indicadas de *F. oxysporum*, obtenidas tras 10 pasajes seriados por plantas de tomate (A), MM (B) e YPGA (C). Se muestra el porcentaje de supervivencia a lo largo de 35 días tras la inoculación. Como controles positivos y negativos, respectivamente, se utilizaron microconidios de la cepa silvestre (wt, curva roja) y agua esteril (H2O). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. El análisis estadístico se realizó según el test Log-Rank (Mantel-Cox) donde *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$ respectivamente.

Ya que *F. oxysporum* es un patógeno oportunista de animales, incluido el ser humano (Nucci & Anaissie, 2007), se realizaron también ensayos de infección en el modelo invertebrado *G. mellonella*, un sistema útil y rápido para el estudio de los mecanismos de virulencia en animales (Navarro-Velasco, *et al* 2011). Para ello, se inyectaron en la hemolinfa del animal $1,6 \times 10^4$ microconidios y se evaluó la mortalidad durante 7-8 días a 30 °C. La mayoría de las poblaciones evolucionadas en plantas y en medio completo mostraron una reducción significativa en la virulencia al compararlas con wt. Concretamente, las larvas inoculadas con P2-10 ($p=0,0020$), P3-10 ($P=0,0165$) y P5-10 ($p < 0,0446$) mostraron

un porcentaje de supervivencia de entre 30-40 % a los cuatro días tras la infección, cuando las infectadas con la cepa wt ya estaban todas muertas (Figura 25.A). También las poblaciones Y2-10 ($P=0,0117$), Y3-10 ($P=0,0144$), Y4-10 ($P=0,0003$) e Y5-10 ($P=0,0030$) provocaron significativamente menos mortalidad, con un porcentaje de supervivencia del 70 % en Y4-10 (Figura 25.C). Sin embargo, en las poblaciones evolucionadas en medio mínimo no se observaron diferencias significativas con la cepa wt (Figura 25.B).

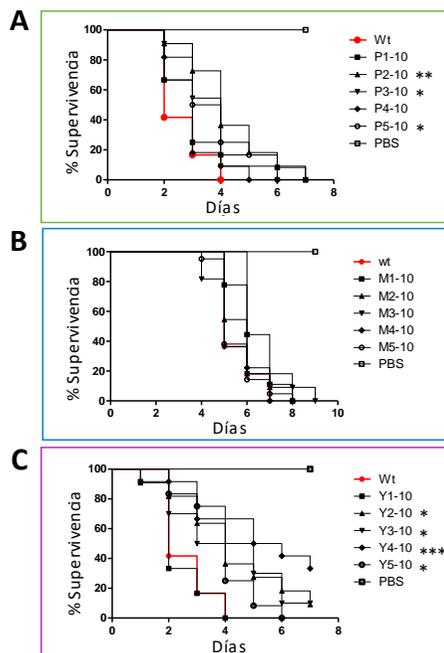


Figura 25. Virulencia en larvas de la miel (*Galleria mellonella*) de las poblaciones obtenidas tras la evolución experimental. Grupos de 15 larvas fueron inoculadas mediante un microinyector con $1.6 \cdot 10^4$ microconidios de las poblaciones indicadas de *F. oxysporum*, de las poblaciones indicadas de *F. oxysporum*, obtenidas tras 10 pasajes seriados por plantas de tomate (A), MM (B) e YPGA (C). Se muestra el porcentaje de supervivencia a lo largo de 7-9 días tras la inoculación. Como controles positivos y negativos, respectivamente, se utilizaron microconidios de la cepa silvestre (wt, curva roja) y solución salina (PBS). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. El análisis estadístico se realizó según el test Log-Rank (Mantel-Cox) donde *** $p < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$ respectivamente.

20.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa silvestre wt.

Con el fin de estudiar los cambios genéticos que pudieran haber ocurrido durante la evolución experimental, se secuenciaron los genomas de las últimas poblaciones, obtenidas tras el pasaje 10, mediante *Next-Generation Sequencing* (NGS) de segunda generación con el método *illumina*. También se re-secuenció el genoma de la cepa silvestre wt, utilizada como inicio del experimento de evolución. Además, para intentar mejorar la anotación disponible se incorporó al análisis los datos obtenidos con el sistema de secuenciación de 3ª generación PaccBio, que genera lecturas más largas que *illumina* lo que permite realizar ensamblajes de regiones más complejas. Todo el análisis bioinformático de los datos de la secuenciación fue llevado a cabo por Dilay Hazal Ayhan en el grupo colaborador de la Prof. Li-Jun Ma, Universidad de Massachussets, Amherst, EEUU (Ayhan, *et al* 2018).

El primer análisis consistió en confrontar la secuencia de la cepa silvestre con la secuencia de referencia depositada originalmente en la base de datos del NCBI (Ma & Van der Does, *et al* 2010). Aunque se trata de la misma cepa, se consideró necesario incluir este control para incorporar en el análisis los posibles cambios o modificaciones ocurridos desde la primera secuenciación, y que pudieran sesgar el resultado del posterior análisis de las poblaciones. Para ello se mapearon las lecturas obtenidas de la cepa wt contra la secuencia de referencia. Se detectaron pocos cambios en las regiones conservadas (Core Región, CR), que engloba los cromosomas 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ni tampoco en el cromosoma accesorio 14. Sin embargo, en los cromosomas 1, 3, 6, 13 y 15 se encontraron divergencias, que llevaron a los cambios en la anotación que se detallan a continuación. Esto es debido a que estos cromosomas contienen regiones repetidas que han impedido hacer un ensamblaje solvente hasta la fecha. En la

secuencia de referencia depositada en el NCBI, el cromosoma 1 tenía una región accesoria (Lineage Specific, LS) de un tamaño aproximado de 0,7 Mb que muestra un elevado grado de homología con una región del cromosoma 15, lo que llevo a la interpretación que ambas regiones tenían un origen común. En base a esta evidencia se decidió anotar la región repetida separadamente como 1&15 (Ayhan, *et al* 2018). Del mismo modo se encontró una zona duplicada en un extremo del cromosoma 13 de un tamaño aproximado de 0,44 Mb no identificada en el primer análisis de secuenciación. Finalmente, se identificó una región común en los cromosomas 3 y 6, difícil de asignar a uno o a los dos cromosomas por lo que se decidió separar y nombrar como 3&6. La anotación de manera independiente de 3&6 hace que los tamaños de los cromosomas 3 y 6 en la nueva organización cromosómica sea mucho menor de lo descrito en el primer análisis (Ma & Van der Does, *et al* 2010). En resumen, basado en este análisis se decidió reorganizar las regiones cromosómicas de una manera considerada más adecuada, agrupando por un lado a los cromosomas con las regiones conservadas 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 y por otro a los cromosomas accesorios 3, 6, 14 15 junto con las regiones repetidas 1&15, 3&6 y una pequeña región del 2 (Figura 26).

Una vez actualizada la secuencia de la cepa wt, se utilizó como referencia para mapear las lecturas de secuencias genómicas obtenidas a partir de las poblaciones evolucionadas. Para ello se diseñó una “pipeline” eficaz capaz de encontrar todos los tipos de cambios producidos en la evolución experimental. El diseño de la “pipeline” fue realizado por Dilay Hazal Ayhan según lo descrito en materiales y métodos.

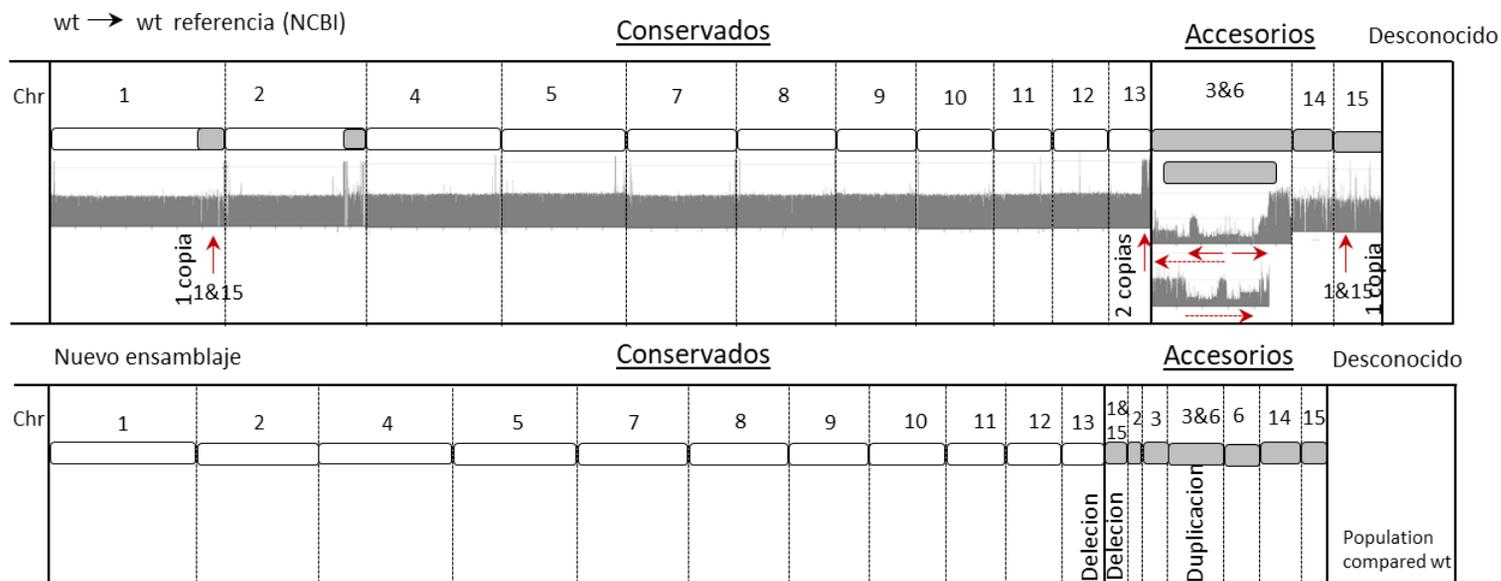


Figura 26. Disposición de los cromosomas de la cepa wt de *F. oxysporum*. (A) según la secuenciación disponible en la base de datos NCBI (Ma & Van der Does, *et al* 2010). **(B)** según la nueva secuenciación utilizada en este trabajo (Ayhan, *et al* 2018).

20.4. Análisis general de los cambios detectados en los genomas de las poblaciones evolucionadas.

A partir de los datos obtenidos en la secuenciación se identificaron cambios genéticos relacionados, por un lado, con reorganizaciones de regiones cromosómicas y las resultantes variaciones en el número de copias (CNVs), y por otro con los distintos eventos como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) inserciones de transposones (TE) y pequeñas inserciones o deleciones (Indels).

Las CNVs detectadas se localizaron fundamentalmente en tres regiones genómicas clasificadas, según la nueva anotación, como 1&15, extremo del cromosoma 13 y 3&6. En los casos de 1&15 y 13, los CNVs corresponden a la pérdida de una de las dos copias presentes en la cepa wt, mientras que en 3&6 se trata una duplicación de la copia original (Figuras 27 y 29). Las poblaciones que mostraron el menor número de CNVs fueron las evolucionadas en plantas (P), con una sola población afectada por cada tipo de CNV (Figura 27.A), seguidas por las del medio mínimo (MM) con 7 CNV repartidos en distintas proporciones entre las cinco líneas; 2 en la región 1&15, 2 en el cromosoma 13 y 3 en la región 3&6. En el otro extremo está el medio completo (YPGA) donde las cinco poblaciones habían perdido una copia de la región 1&15 y del extremo del cromosoma 13, mientras dos mostraban la duplicación de la región 3 &6.

Otro foco de interés se centra en el número de mutaciones encontradas en las distintas condiciones experimentales. Sumando todos los eventos encontrados en las cinco poblaciones secuenciadas, se observa que la condición donde más mutaciones se acumularon fue la de planta con un total de 61, seguida de YPGA con 46 y MM con 22 mutaciones. Hay que destacar que, aunque la diferencia en el número de eventos entre condiciones es grande, la proporción de los tres tipos caracterizados, SNPs, transposones e Indels se mantiene más o menos constante. En todos los casos, el mayor porcentaje de mutaciones

correspondió a las producidas por inserción de TE, que osciló entre el 67 % en YPGA y el 45 % en MM. El segundo tipo más representado fueron los SNPs con porcentajes cercanos al 30 % y por último los Indels con valores cercanos al 15 % (Figura 27.B).

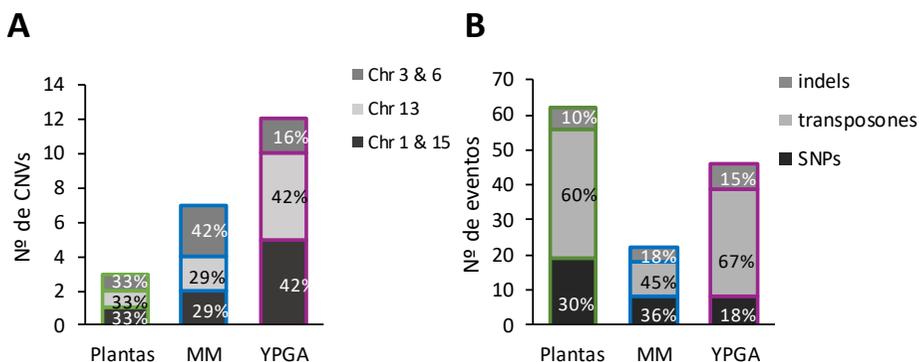


Figura 27 Distribución de los cambios genéticos detectados en las poblaciones obtenidas en las tres condiciones de evolución experimental. Distribución de variaciones en el número de copias (CNVs) de las regiones 1 & 15, 13 y 3 & 6 (A) o de las inserciones y deleciones (indels), inserciones de transposones y polimorfismos en un único nucleótido (SNPs) (B) entre las poblaciones obtenidas en cada una de las condiciones de evolución, plantas de tomate, medio completo (YPGA) y medio mínimo (MM). Los números en las columnas indican los porcentajes de cada tipo de cambio en el total de cambios en la condición.

El mayor número de deleciones grandes asociadas a CNVs se observó en la condición de YPGA, seguida de MM y plantas (Figura 28.A). Por otro lado, la ganancia de material genético por duplicaciones supuso una menor incidencia en las distintas poblaciones al tratarse de un CNV con baja frecuencia en todas las condiciones experimentales.

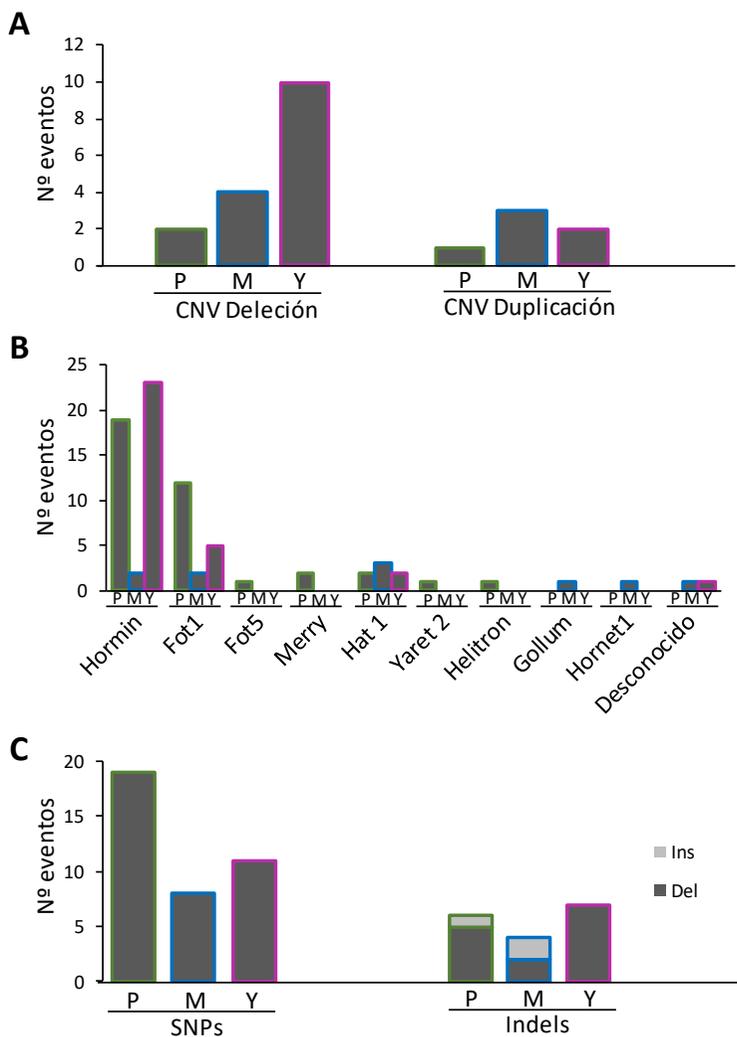


Figura 28. Tipos de cambios genéticos detectados en las poblaciones obtenidas en las tres condiciones de evolución experimental. Se muestra el número total de eventos en poblaciones de pasajes por planta (P), medio mínimo (M) y medio completo YPGA (Y). (A) Variación en el número de copias (CNVs); (B) Inserciones por los tipos indicados de transposones; (C) Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e Indels.

Dentro de los distintos tipos de eventos, la inserción de transposones fue la que en mayor porcentaje fue detectada en las tres condiciones de evolución. El análisis de secuencia permitió identificar la clase de transposones y determinar su proporción. En total se encontraron inserciones de 10 tipos de transposones (TE): hormin, Fot1, Fot5, Merry, Hat1, Yaret2, Helitron, Gollum, hornet1 y un

transposon desconocido que no corresponde a ningún tipo descrito en la bibliografía (Figura 28.B). El TE encontrado en mayor número fueron hormin con 44 de los 78 eventos totales contabilizados en las tres condiciones y fot1 con 19 eventos. Las dos condiciones de selección donde más inserciones de TE se observaron fue planta y YPGA, aunque hay que tener en cuenta que, como mencionado antes, el número total de eventos en MM fue muy inferior al de las otras dos condiciones. La incidencia del resto de TE fue muy baja o exclusiva de una sola condición, como es el caso del Fot 5, Merry, Yaret 2 y Helitron detectados solo en poblaciones de plantas o Gollum y Hornet1 encontrados solo en el MM. Con respecto al resto de los eventos, se identificaron 39 SNPs en total entre las distintas condiciones de selección: 20 en planta, 8 en MM y 11 en YPGA. Del mismo modo el número de Indels, el tipo de evento con la incidencia más baja se repartió con 9 en planta, 4 en MM y 7 en YPGA (Figura 28.C).

20.5. Cambios genéticos detectados en cada una de las poblaciones y condiciones experimentales

La información expuesta hasta ahora aporta una visión general de los cambios genéticos seleccionados durante la evolución experimental, tras diez pasajes por planta, placas de MM o de YPGA. Sin embargo, esa visión global no tiene en cuenta lo ocurrido en cada una de las cinco líneas independientes.

En la Figura 19 se muestran los eventos detectados en cada una de las poblaciones secuenciadas, ordenados según la anotación descrita en el apartado 20.3. De esta manera, todos los cromosomas están en la misma línea, separados en tres grupos: regiones conservadas, accesorias (ambas asignadas a un determinado cromosoma) o no asignadas a un cromosoma.

La representación de los CNVs se realizó en color continuo con valor uno si no había cambios de la cobertura, es decir, variación el número de lecturas

alineadas respecto a la cepa wt. Esto permite visualizar la pérdida de copia o deleción en el extremo del cromosoma 13 y en la región 1&15 (también se observa en una parte del cromosoma 15), con la consiguiente reducción en la cobertura hasta el 0,5 según la proporción de la población que haya perdido una copia. Las poblaciones que perdieron una copia de la región del cromosoma 13 fueron P3, M1 y M4 y todas las de YPGA, de Y1 a Y5. De manera similar, la reducción del número de copias en la región 1&15 se vió en P5, M3 y M5 y en todas las de YPGA (Figura 29). En el caso de los CNVs identificados como duplicaciones, se puede observar como la cobertura de la región 3&6 (y parte del cromosoma 6) en algunas poblaciones aumenta del valor inicial 1 a valores cercanos a 2, indicando una duplicación en la población afectada. Las poblaciones donde se encontró esta duplicación fueron P2, M1, M3, M5, Y1 e Y5, aunque en esta última la duplicación se encuentra aún en un porcentaje bajo de la población. Si clasificamos según el número de líneas afectadas sobre el total, la incidencia de ambas deleciones fue del 53 %, mientras para la duplicación fue tan solo del 33 %. Estos resultados confirman los ya detectados en el cómputo general respecto al número de lecturas obtenidas, por lo tanto, el tamaño total del genoma en las poblaciones. Es decir, la condición que dió lugar a las poblaciones con menor volumen total de secuencias fue YPGA.

La posición genómica de todos los tipos de eventos encontrados en las poblaciones evolucionadas puede verse de manera conjunta con los CNVs en la figura 19 según distintos símbolos identificativos: una cruz (+) para los SNPs, un cuadrado (□) para las inserciones, un triángulo (Δ) para las deleciones y un rombo (◇) para los transposones. Se identificaron un total de 123 mutaciones en las 15 poblaciones. Se detectaron diferencias importantes en el número de eventos entre las tres condiciones experimentales: 61 eventos en planta, 46 en YPGA y tan solo 22 mutaciones en MM. En general se aprecia una distribución más o menos homogénea de los eventos a lo largo de todos los cromosomas. En las cinco líneas de plantas la distribución de los eventos es la más amplia, tanto en

las regiones conservadas como en las accesorias y no asignadas, con el mayor número de eventos relativos a inserciones de transposones. Regiones con mayor número de eventos incluyen, por ejemplo, un extremo del cromosoma 8 o el cromosoma 13, aunque hay que destacar que no afectan a la zona duplicada. Uno de los puntos que podrían considerarse como “calientes” se observa en la población P4, con múltiples inserciones de transposones en la región 3&6 y en el cromosoma 6, regiones donde también se observan mutaciones en P3 y P5, pero no en P2 con la zona duplicada y en P1, que muestra el menor número de mutaciones totales. En las poblaciones seleccionadas en medio mínimo, el número de eventos encontrados fue en general muy inferior al de las otras dos condiciones experimentales. De las cinco líneas del MM solo M2 tubo ausencia total de mutaciones tanto de CNVs como de eventos. Sin embargo, la gráfica del número de lecturas alineadas mostró picos de lecturas distribuidos de manera irregular en todos los cromosomas. Este efecto también se puede ver en la línea M1 y levemente en M3 pero no así en las otras líneas de la misma condición ni en las otras condiciones por lo que parece exclusivo el medio mínimo. En la condición de YPGA, aunque la distribución de los eventos se repartió a lo largo de todos los cromosomas, destaca una región no asignada a un cromosoma (U9), en la que se detectó un evento repetido en cuatro poblaciones independientes, producido por la inserción de un TE que se explicara en detalle más adelante.

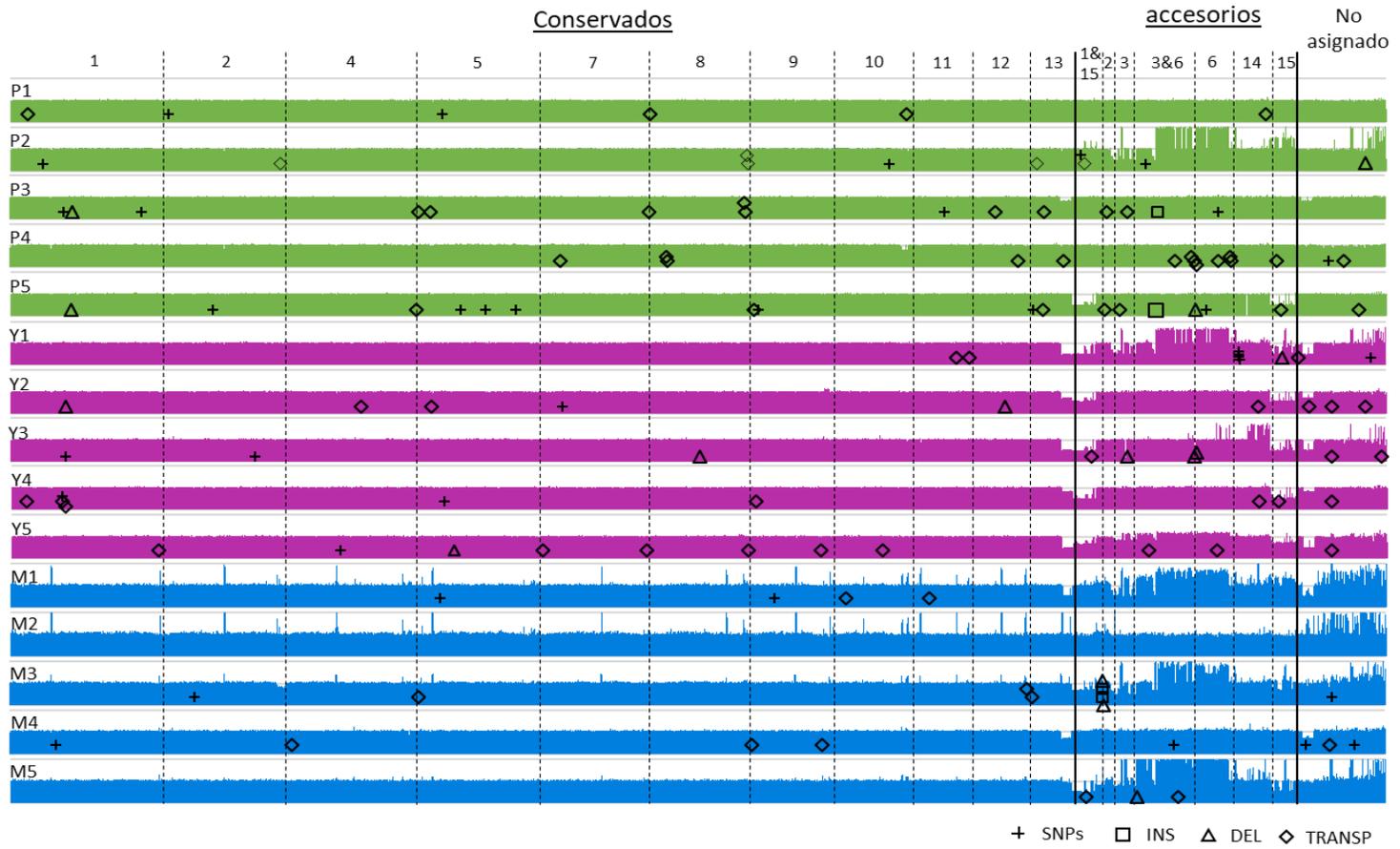


Figura 29. Distribución de los eventos encontrados en las 15 poblaciones secuenciadas por illumina. Se muestra en color continuo las gráficas de cobertura normalizadas a la cobertura del genoma medio donde el verde fue para las líneas evolucionadas en planta (P1, P2, P3, P4, P5) azul para la evolucionadas en medio mínimo (M1, M2, M3, M4 y M5) y morado para las evolucionadas en medio completo (Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5). Del mismo modo se muestran los distintos eventos encontrados y distribuidos según su posición relativa a cada cromosoma y la siguiente simbología una cruz (+) para los SNPs, un cuadrado (□) para las inserciones, un triángulo (Δ) para las deleciones y un rombo (◇) para los transposones.

El ANEXO I muestra una lista pormenorizada con todos los eventos detectados, donde se presenta toda la información relevante, incluyendo población, cromosoma, gen afectado si lo hubiera con número de identificación FOXG, posible función, posición relativa de la mutacion, tipo de evento y frecuencia en la población. Además, en los siguientes apartados se hablará con más detalle de algunos eventos encontrados en las poblaciones.

20.5.1. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por plantas de tomate

En la tabla 15 se presenta una lista de los eventos encontrados en cada una de las poblaciones evolucionadas en planta, clasificados en SNPs, transposones o Indels y su posición relativa al gen: en la CDS, un intrón, o en la zona 5'UTR o 3'UTR; aguas arriba (región promotora), aguas abajo (región terminadora) o intergénica, es decir en una zona no asociada a un gen. La población con el mayor número de eventos es P5 (20), seguida de P3 (14), P4 (11), P2 (9) y P1(7). La mayoría de las mutaciones están en la CDS (19), que corresponde a cambios en la fase codificante de la proteína según el tipo de evento, y en la región aguas arriba (15) y aguas abajo (13). En su conjunto, estos cambios suponen el 75 % del total de las mutaciones encontradas en las cinco líneas de la condición experimental de planta.

Tabla 15. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en plantas clasificadas por su posición relativa respecto al gen.

	P1			P2			P3			P4			P5		
	Tr	Sn	In	Tr	Sn	In	Tr	Sn	In	Tr	Sn	In	Tr	Sn	In
Total	5	2	0	4	4	1	8	4	2	10	1	0	10	7	3
CDS	1	-	-	2	2	-	3	-	1	2	-	-	3	3	2
UTRs	-	1	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1	-
Ag. arriba	2	-	-	1	-	-	3	-	1	2	1	-	1	3	1
Ag. abajo	2	-	-	-	2	-	-	1	-	5	-	-	3	-	-
intron	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-
intergen	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-

Tr= transposon; Sn= SNPs; In=Indels

En la tabla 16 se muestra un resumen de los genes afectados en la región codificante junto con los que tienen la mutación aguas arriba del gen (<1000 pb desde el ATG). La clasificación se ha realizado según la línea donde se ha encontrado el evento, la identificación del gen (número FOXG asignado), localización de la mutación respecto al gen, tipo de evento y frecuencia en la población. El estudio de los eventos permitió descubrir que varios genes estaban afectados en dos líneas distintas, P3 y P5 (señalados en rojo), en todos los casos con la mutación anotada en la misma posición nucleotídica. Los genes afectados fueron FOXG_22266 (CDS), FOXG_04683 (CDS), FOXG_22360 (Aguas arriba), FOXG_00110 (CDS) y FOXG_12102 (intron). Un análisis detallado indicó que en este caso se trataba de un artefacto de mezcla entre dos líneas (ver detalles más abajo).

Para cada gen afectado se realizó una búsqueda blastp con la secuencia proteica en la base de datos NCBI, con el fin de conocer la posible función.

Tabla 16. Resumen de los genes en las poblaciones evolucionadas en plantas que muestran eventos en la región codificante (CDS) o <1000 pb aguas arriba del gen.

Población	Gen	Función	Loc to gen	Evento	Frecuen
P1	FOXG_05595 FOXG_05596	Proteína hipotética/proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	0,75
	FOXG_10785	Protein with similarity to nonribosomal peptide synthases (NRPS-like)	CDS	Transposon	0,74
	FOXG_22509	Ave1	Ag. arriba	Transposon	0,5
P2	FOXG_08732	NAD(P)-binding domain protein	CDS	Transposon	0,8
	FOXG_15821	Alkanal monooxygenase	Ag. arriba	Transposon	0,85
	FOXG_22022	Proteína hipotética	CDS	Transposon	1
	FOXG_11096	Pectin lyase B precursor	CDS	SNP	1
	FOXG_10196	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	CDS	SNP	1
P3	FOXG_22266	Cupredoxina	CDS	Transposon	0,4
	FOXG_04683	Proteína hipotética	CDS	Transposon	0,3
	FOXG_21890	Probable NADPH2 dehydrogenase chain OYE2	Ag. arriba	Transposon	0,67
	FOXG_20375	NAD(P)H-binding	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_15786 FOXG_22136	Glycoside hydrolase/mfs quinate transporter	Ag. arriba	Transposon	0,6
	FOXG_13444	Related to ankyrin 3	CDS	Transposon	0,37
	FOXG_22360	Proteína hipotética	Ag. arriba	DEL	0,5
	FOXG_00110	Putative ATP-dependent helicase fft2	CDS	INS	0,5
P4	FOXG_16232	High-osmolarity-induced transcription protein 1	Ag. arriba	Transposon	0,55
	FOXG_22790	Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG17251	Proteína hipotética	CDS	Transposon	0,6
	FOXG_22586	Transcription factor	CDS	Transposon	
	FOXG_22837	Hypothetical protein	Ag. arriba	SNP	1
P5	FOXG_22266	Cupredoxina	CDS	Transposon	1
	FOXG_21846	Maltose fermentation regulatory MAL33	CDS	Transposon	0,5
	FOXG_04683	Proteína hipotética	CDS	Transposon	1
	FOXG_22255	Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	1
	FOXG_06212	Related to pig tubulin-tyrosine ligase	CDS	SNP	1
	FOXG_18219	Proteína hipotética	Ag. arriba	SNP	0,9
	FOXG_07021	Pogo transposable element	Ag. arriba	SNP	0,57
FOXG_15845	Variant-surface-glycoprotein phospholipase C	Ag. arriba	SNP	1	

Población	Gen	Función	Loc to gen	Evento	Frecuen
	FOXG_08994	Glu/asp-tRNA amidotransferase subunit A	CDS	SNP	1
	FOXG_11967	Non-ribosomal peptide synthetase	CDS	SNP	1
	FOXG_00110	Putative ATP-dependent helicase fft2	CDS	DEL	1
	FOXG_22360	Proteína hipotética	Ag. arriba	DEL	1
	FOXG_06976	Proteína hipotética	CDS	DEL	1

20.5.2. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por placas de medio mínimo

Como ya se ha mencionado anteriormente, el medio mínimo fue la condición en la que se seleccionaron el menor número de eventos. En la tabla 17 se puede ver la disposición de estos según la misma clasificación utilizada en el apartado anterior para plantas. Según la línea analizada, el número de eventos varió desde 8 en M4 (8) seguida por M3 (7), M1(4), M5 (2) y finalmente M2 con ningún cambio detectado. Según la posición relativa respecto al gen nuevamente se observa una tendencia a fijarse más eventos dentro de la zona CDS (7), aguas arriba (4) y aguas abajo (4) lo que supone el 71 % del total de las mutaciones encontradas en las cinco líneas, aunque tb se detectó un número relativamente elevado de eventos localizados en regiones intergénicas (5).

Tabla 17. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en placas de medio mínimo clasificadas por su posición relativa respecto al gen.

	M1			M2			M3			M4			M5		
	Tr	Sn	In												
Todos	2	2	0	0	0	0	3	2	2	4	4	0	1	0	1
CDS	1	1	-	-	-	-	1	-	-	2	1	-	-	-	1
UTRs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ag. arriba	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
Ag. abajo	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-
intron	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
intergenic	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	2	-	-	-	-

Tr= transposon; Sn= SNPs; In=Indels

Tabla 18. Resumen de los genes en las poblaciones evolucionadas en placas de medio mínimo que muestran eventos en la región codificante (CDS) o <1000 pb aguas arriba del gen.

Población	Gen	Función	Loc to gen	Evento	Frecuen
M1	FOXG_13710	cAMP-dependent protein kinase pathway protein (Som1), putative	Ag. arriba	Transposon	0,2
	FOXG_09621	Gentisate 1,2-dioxygenase	CDS	Transposon	1
	FOXG09359	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha	CDS	SNP	1
M3	FOXG_14777	Related to ankyrin repeat	Ag. arriba	Transposon	0,57
	FOXG_11926	Methylisocitrate lyase	CDS	Transposon	0,23
M4	FOXG_12897	GNT1 alphaN-acetylglucosamine transferase K. lactis	CDS	Transposon	
	FOXG_21009	Proteína hipotética	CDS	Transposon	
	FOXG_19455; FOXG_07441	Proteína hipotética / Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_08873; FOXG_19940	Choline dehydrogenase/CysQ, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) 3'-phosphatase, partial	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_11273	Velvet complex subunit A	CDS	SNP	0,84
M5	FOXG_21359	Proteína hipotética	CDS	DEL	1

20.5.3. Eventos seleccionados en las poblaciones tras diez pasajes por placas de medio completo

El número de mutaciones contabilizadas para la condición de evolución experimental de medio completo fue de 41 repartidas en las cinco líneas independientes el

En la tabla X se observa que la línea con el mayor el número de eventos fue Y5 (11) seguida de Y2 (10), Y3 (4), Y4 (2) e Y1 con tan solo 7. Nuevamente se observa la preferencia para fijarse eventos con posición dentro de la región codificante (23), aguas arriba (11) y aguas abajo (6) con el 89 % del total de las mutaciones encontradas en las cinco líneas, aunque también se detectó un número elevado de eventos localizados en la zona intergénica (5)

Tabla 19. Número y tipo de eventos encontrados en las cinco poblaciones evolucionadas en plantas clasificadas por su posición relativa respecto a los genes.

	Y1			Y2			Y3			Y4			Y5		
	Tr	Sn	In												
Todos	3	2	2	7	1	2	6	2	1	6	2	0	9	1	1
CDS	2	-	-	2	1	2	1	2		4	2	-	6	-	1
UTRs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Ag. arriba	-	1	1	2	-	-	3	-	1	-	-	-	3	-	-
Ag. abajo	-	-	-	3	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-
intron	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
intergenic	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Tr= transposon, Sn= SNPs, In=Indels

La comparación de los eventos entre líneas reveló múltiples líneas con mutaciones en distintos sitios de la fase abierta de lectura (ORF) en dos genes, FOXG_21009 y FOXG_00016 (marcadas en rojo). Las líneas Y2, Y3, Y4 e Y5 portan una inserción del mismo transposon (hormin, versión miniatura de hornet) en distintos puntos de FOXG_21009, además se encontraron distintos tipos de mutaciones en el gen FOXG_00016 en las líneas Y2, Y3 e Y4.

Tabla 20. Resumen de los genes en las poblaciones evolucionadas en placas de medio completo que muestran eventos en la región codificante (CDS) o <1000 pb aguas arriba del gen.

Población	Gen	Función	Loc to gen	Evento	Frecuen
Y1	FOXG_09993	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B	CDS	Transposon	0,6
	FOXG_17010	Proteína hipotética	CDS	Transposon	0,5
	FOXG_14157	BTB/POZ domain-containing protein, partial	Ag. arriba	SNP	0,7
	FOXG_16733	Proteína hipotética	Ag. arriba	DEL	0,4
Y2	FOXG_03877F OXG_03878	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_04627F OXG_04628	Probable RCO3-glucose transporter/ Mannan endo-1,6-alpha-mannosidase DCW1	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_21009	Proteína hipotética	CDS	Transposon	1
	FOXG_17680	Proteína hipotética	CDS	Transposon	
	FOXG_04961	Relativo a protein TOL	CDS	SNP	0,5

Población	Gen	Función	Loc to gen	Evento	Frecuen
	FOXG_00016	Velvet complex subunit B	CDS	DEL	0,86
	FOXG_13565	<u>Caryophlyene sintasa</u>	CDS	DEL	
Y3	FOXG_14802	Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_15093	Proteína transportadors Chromate	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_14389	Proteína transportadors Chromate	Ag. arriba	Transposon	0,2
	FOXG_21009	Proteína hipotética	CDS	Transposon	1
	FOXG_00016	Velvet complex subunit B	CDS	SNP	1
	FOXG_08386	Putativa exonucleasa V	CDS	SNP	1
	FOXG_03284	Proteína hipotética	Ag. arriba	DEL	1
Y4	FOXG_10848	Maltosa fermentacion regulado proteina MAL33	CDS	Transposon	
	FOXG_00016	Velvet complex subunit B	CDS	Transposon	0,1
	FOXG_08908	Actividad Carbon-nitrogen ligase	CDS	Transposon	
	FOXG_21009	Proteína hipotética	CDS	Transposon	1
	FOXG_00016	Velvet complex subunit B	CDS	SNP	0,87
	FOXG_01429	Enzima Ubiquitin-conjugating E2 J1	CDS	SNP	0,8
Y5	FOXG_01240	NmrA-like family domain-containing protein-like protein	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_21002F OXG_12611	Proteína hipotética/Proteína hipotética	CDS	Transposon	
	FOXG_19620	Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_04737	Carotenoide 9	CDS	Transposon	
	FOXG_10796	dominios N-acetyltransferase activity	CDS	Transposon	
	FOXG_15766	Proteína hipotética	Ag. arriba	Transposon	
	FOXG_12897	Related to GNT1 alphaN-acetylglucosamine transferase K. lactis	CDS	Transposon	
	FOXG_11575	Proteína hipotética	CDS	Transposon	
	FOXG_21009	Proteína hipotética	CDS	Transposon	0,4

20.6. Seguimiento de la dinámica de los CNVs identificados en las poblaciones evolucionadas

Ya que solamente se secuenciaron los genomas de las poblaciones evolucionadas tras el pasaje 10, el análisis bioinformático solo proporcionó el resultado final, en términos de mutaciones seleccionadas, del experimento evolución experimental, junto con las frecuencias de esas mutaciones en las distintas poblaciones.

Para hacer un seguimiento de las mutaciones encontradas a lo largo del experimento se extrajo el ADN genómico total de las poblaciones guardadas en los pasajes anteriores de todas las líneas evolucionadas y se diseñaron diferentes estrategias de detección cuantitativa según el tipo de mutación.

20.6.1. Optimización del protocolo para la detección cuantitativa de CNVs

Como se ha mencionado anteriormente, la cepa silvestre se utilizó como secuencia de referencia para el mapeo de las diferentes poblaciones evolucionadas, fijando la cobertura inicial de dicha cepa con un valor 1, a partir de la cual se deducían los cambios en el número de copias producidos por CNVs (Figura 33.A). De esta manera, en el caso de pérdida de una copia, como es el caso de las regiones duplicadas 1&15 y extremo del cromosoma 13, la cobertura pasaría de 1 copia en la cepa silvestre a 0,5 copias. Por lo tanto, un valor final de 0,5 nos indicaría que la pérdida de una de las copias está fijada en el 100 % de la población. Consecuentemente, los valores porcentuales de la delección en la población se han de deducir dentro del intervalo 1-0,5 considerando 1 como población con el 100 % de los individuos portando las dos copias y 0,5 como 100 % de los individuos con una sola copia (Figura 30.B). Por otro lado, en el caso de una duplicación de la región 3&6 el valor pasaría de 1 en la cepa silvestre a 2 en

las poblaciones con el evento fijado (Figura 30.B). Es decir, el valor 1 indica que el 100 % de la población tiene una copia, mientras 2 que indica que el 100 % de la población tiene dos copias.

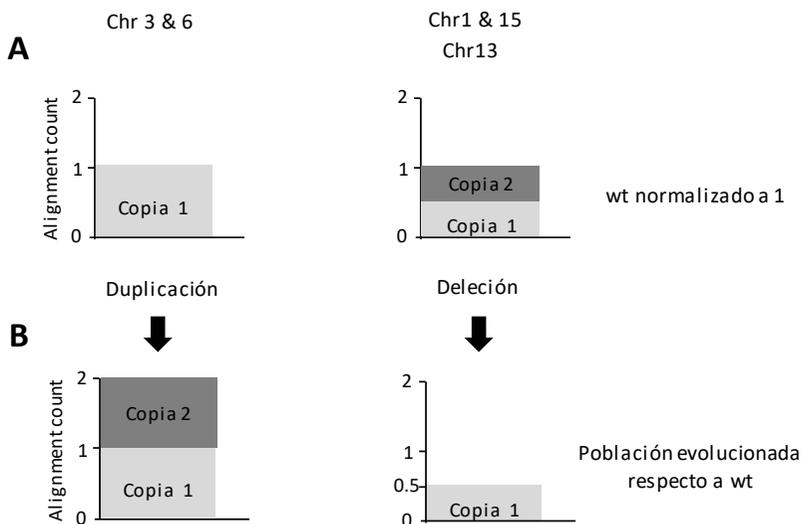


Figura 30. Esquema del recuento de lecturas de una región genómica cuyo número de copias se deduce mediante el análisis de CNVs. (A) Normalización al valor 1 del número de lecturas alineadas con la única copia de la región cromosómica 3&6 o las dos copias de las regiones 1&15 y 13 en la cepa silvestre wt. (B) Variación en el número de lecturas alineadas a partir del cual se deduce el cambio en número de copias (CNV) encontradas en las poblaciones.

Una vez establecidos los criterios de interpretación de los datos arrojados por la secuenciación del último pasaje, se determinó si en distintas poblaciones con el mismo CNV, este se fija e de manera similar. Para ello se utilizó un método de PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos de las zonas afectadas por el CNV, utilizando como gen de referencia el gen de la actina y la cepa silvestre. Para validar el método y confirmar las frecuencias alélicas obtenidas en el análisis de secuenciación, en todos los casos se incluyó el micelio del pasaje 10, lo que permitió comparar los datos obtenidos por PCR cuantitativa con los generados por secuenciación.

20.6.2. Seguimiento de la dinámica de los CNVs durante la evolución de las poblaciones

El análisis de la dinámica de los CNVs encontrados permitió conocer datos tan importantes como el pasaje en cual surgieron o la rapidez con la que se fijaron en la población durante los pasajes 1-10.

El cromosoma 13 con su extremo duplicado de aproximadamente 0,44 Mb, supone el primer ejemplo de CNV con delección. La pérdida de una de las copias se detectó en 8 de las 15 líneas evolucionadas. La más destacada fue la condición experimental de medio completo, donde todas las líneas evolucionadas perdieron la segunda copia.

En P3, la única línea de plantas afectada por este CNV, el pasaje donde surgió la delección fue el 3, aunque en una proporción muy baja. Solo a partir del pasaje 7 la frecuencia en la población se incrementó hasta alcanzar un valor del 30 % tras el último pasaje. Cabe destacar que este último dato, determinado por qPCR, coincidió con el valor calculado según los datos de secuenciación, donde la cobertura detectada refleja un valor del 34 % (Figura 31).

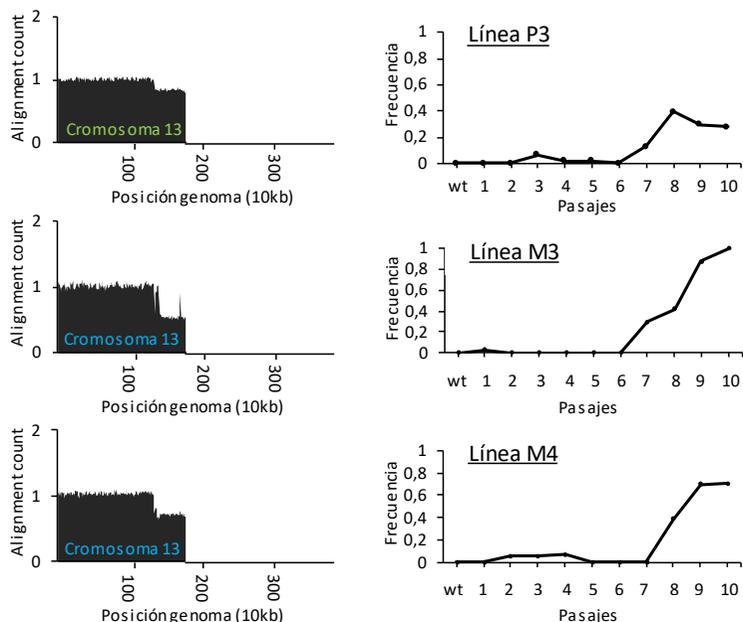


Figura 31. Dinámica evolutiva del CNV en el cromosoma 13 a lo largo de la evolución experimental. (Panel izquierdo) Las graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición del cromosoma 13 tras el pasaje 10 en las poblaciones P5, M3 y M4, relativo al wt. (panel derecho) El grafico muestra la evolución de la frecuencia del CNV en el cromosoma 13 en la población, cuantificada a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, utilizando como valor de referencia el gen de copia única actina.

En la condición de medio mínimo, las líneas M3 y M4 mostraron tendencias muy similares. En ambos casos la perdida de una copia empezó a producirse a partir del pasaje 7 hasta alcanzar rápidamente el 100 % o 80 %, respectivamente.

La condición experimental donde más veces se seleccionó este CNV fue en el medio completo YPGA (Figura 32). En general, si dividimos las cinco líneas entre aquellas en las que el CNV alcanza el 100 % de la población y aquellas en las que no, se pueden distinguir dos grupos. El primero agrupa las líneas Y1, Y3 e Y5 que muestran un patrón similar al observado en las condiciones de plantas y medio mínimo, con incrementos de fijación similares entres pasajes y llegando en todos los casos a la fijación o muy cerca de ella.

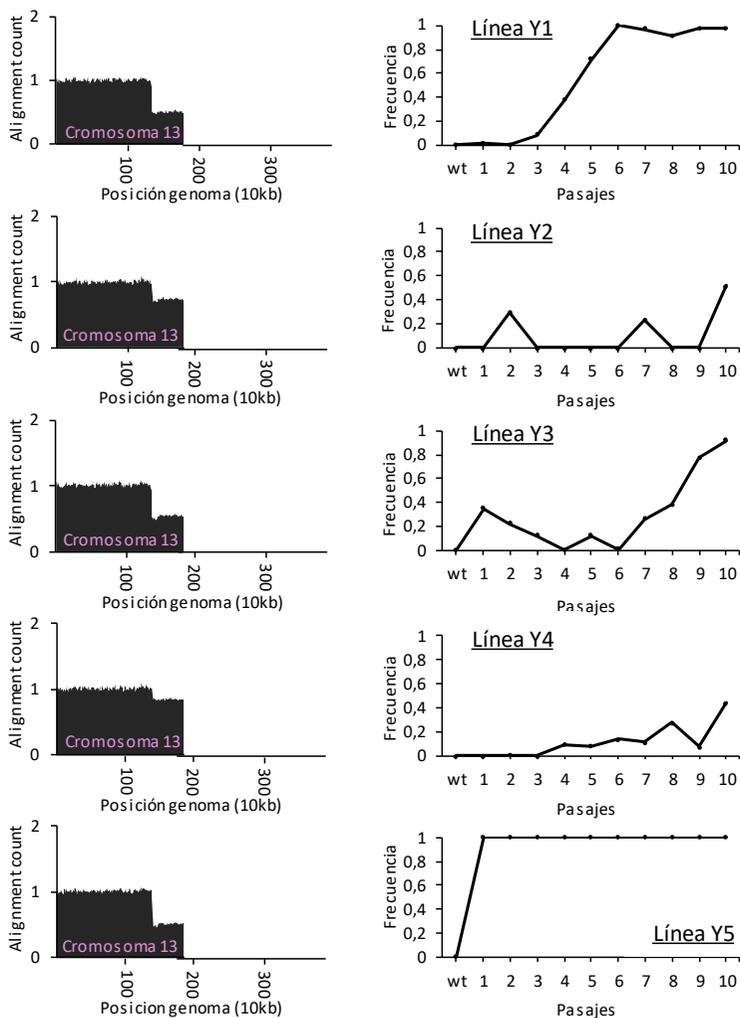


Figura 32. Dinámica evolutiva del CNV en el cromosoma 13 a lo largo de la evolución experimental. (Panel izquierdo) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición del cromosoma 13 encontradas tras el pasaje 10 en las poblaciones Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5, relativo al wt. (panel derecho) El grafico muestra la evolución de la frecuencia del CNV en el cromosoma 13 en la población, cuantificada a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, utilizando como valor de referencia el gen de copia única actina.

El segundo grupo incluye las líneas Y2 e Y3 que muestran dinámicas donde el CNV no llega a fijarse completamente. Y2 tiene una curva errática con dos arranques en los pasajes 2 y 7, que sin embargo se eliminan completamente en el siguiente, mientras en Y3 la curva muestra una fase estacionaria entre los

pasajes 4 y 9 a un bajo porcentaje (10 %) para alcanzar en el último pasaje un valor final del 45 %.

El otro CNV importante que se identificó es la delección de una copia de la región 1&15. Nuevamente, todas las líneas de medio completo estuvieron afectadas, en este caso junto con P5, M3 y M5. En la gráfica de la línea P5 (Figura 33) se observa cómo la población empezó a perder la segunda copia entre los pasajes 4 y 5, con un incremento importante en el pasaje 6. Finalmente, la delección se fijó en la población entre los pasajes 7 y 8. En la condición experimental de medio mínimo, M3 fue la donde más tarde se detectó el CNV en el pasaje 8, que posteriormente alcanzó un valor alrededor del 50 %. En M5 el inicio se produjo en el pasaje 4 hasta alcanzar el 100 % en el pasaje 10.

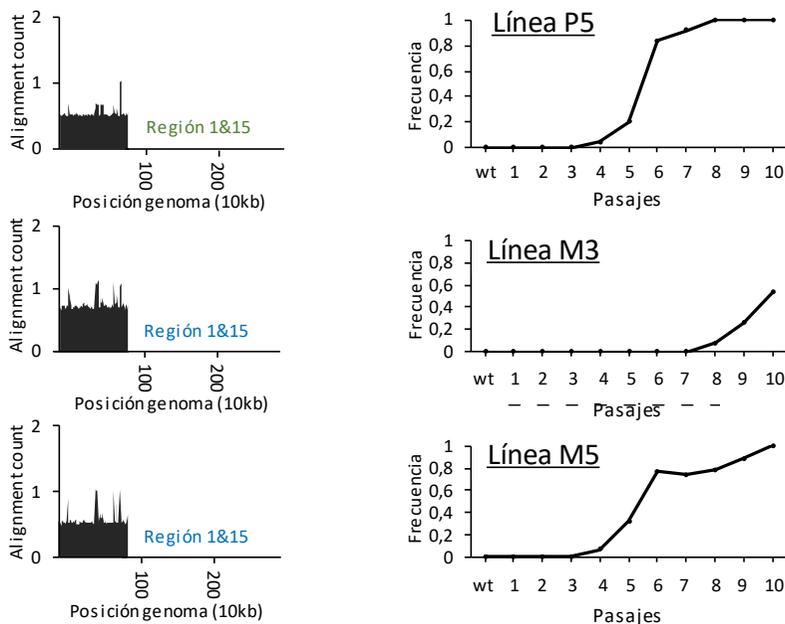


Figura 33. Dinámica evolutiva del CNV en la región 1&15 a lo largo de la evolución experimental. (Panel izquierdo) Las graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición de la región 1&15 encontradas tras el pasaje 10 en las poblaciones P5, M3 y M5, relativo al wt. (panel derecho) El grafico muestra la evolución de la frecuencia del CNV en la región1&15 en la población, cuantificada a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, utilizando como valor de referencia el gen de copia única actina.

En las cinco líneas del medio completo, el CNV mostró nuevamente dos grupos con dinámicas evolutivas distintas (Figura 34). El primer grupo reúne a las líneas Y1, Y2 e Y3, que se caracterizan por una aparición temprana de la delección, seguida en todos los casos por un tramo con frecuencias similares durante tres o cuatro pasajes hasta alcanzar rápidamente el 100 % de la población al final del experimento. El otro grupo, que incluye las líneas Y4 e Y5, mostró un perfil distinto ya que se observa un porcentaje más elevado al inicio. Posteriormente, la fijación en la población fue distinta. En la línea Y4 se mantuvo una frecuencia más o menos constante alrededor del 70 % durante cinco pasajes (3-7), mientras que en Y5 incremento sucesivamente hasta fijarse en la población en el pasaje 7.

El tercer y último CNV encontrado fue el identificado como 3&6, que corresponde a una duplicación de dicha región. En este caso, las líneas afectadas fueron P2 en plantas, M1, M3 y M5 en medio mínimo e Y1 en medio completo (Figura 35). En la línea P2, la duplicación alcanzó rápidamente el 100 % de la población en el primer pasaje, manteniendo un periodo estable de fijación en la población hasta el pasaje 7, seguido por una pequeña bajada al 80% y una nueva fijación tras el último pasaje. Por otro lado, la dinámica del CNV en las tres líneas afectadas en el medio mínimo M1, M3 y M5 muestra un patrón similar entre ellas, con un inicio del CNV temprano con porcentaje bajo y un final del experimento donde la frecuencia se incrementa rápidamente hasta alcanzar el total de la población en M3 y M5.

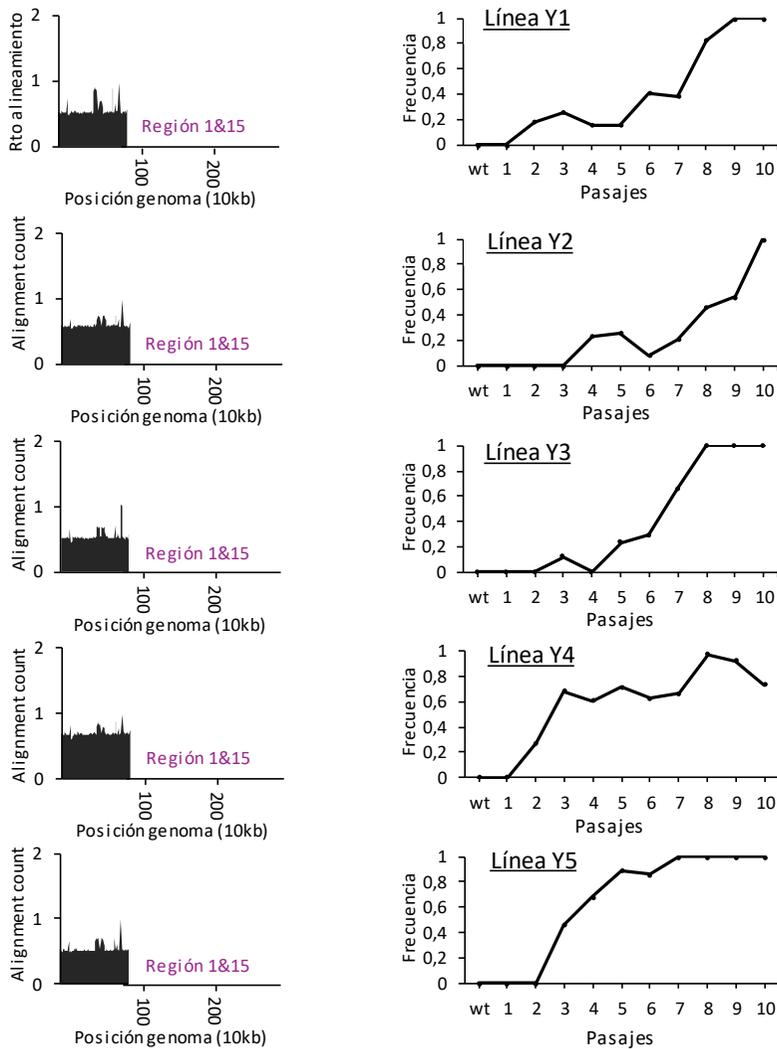


Figura 33. Dinámica evolutiva del CNV en región 1&15 a lo largo de la evolución experimental. (Panel izquierdo) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición de la región 1&15 encontradas tras el pasaje 10 en las poblaciones Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 P5, relativo al wt. (panel derecho) El gráfico muestra la evolución del CNV del cromosoma 13 detectado a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina.

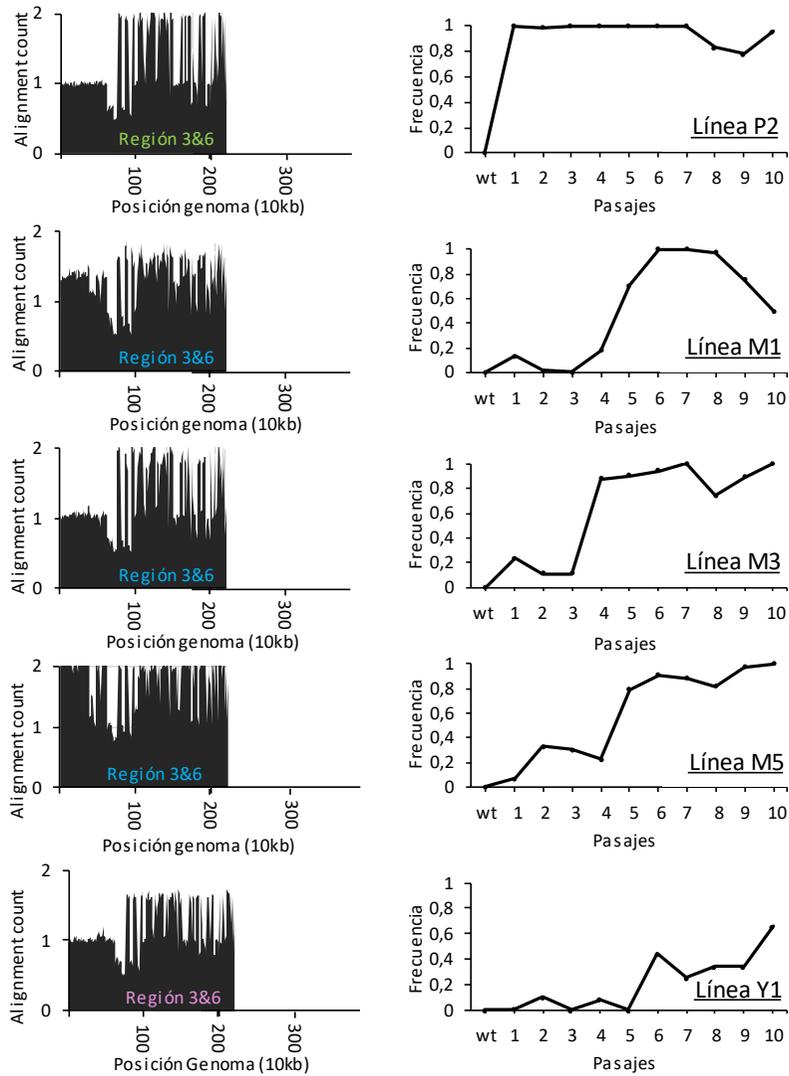


Figura 34. Dinámica evolutiva del CNV en región 3&6 a lo largo de la evolución experimental. (Panel izquierdo) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición de la región 1&15 encontradas tras el pasaje 10 en las poblaciones P2, M3, M5, Y1, relativo al wt. (panel derecho) El grafico muestra la evolución del CNV del cromosoma 13 detectado a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina.

20.7. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels durante la evolución de las poblaciones.

Se realizó un estudio parcial de la dinámica de las frecuencias de algunos de los otros eventos encontrados. Para la cuantificación de las inserciones de transposones, SNPs e Indels fue necesario utilizar distintas metodologías que se describen a continuación.

20.7.1. Método para el cálculo de frecuencias alélicas para inserciones por transposones.

La cuantificación de las inserciones por transposones se realizó mediante PCR a tiempo final utilizando oligonucleótidos que flanquean la inserción (Figura 35.A). De esta manera se obtuvieron dos productos de amplificación distintos, uno más corto en la cepa silvestre y otro más largo que añade el tamaño del transposon. La cuantificación de las frecuencias alélicas en las poblaciones se realizó sobre las dos bandas de amplificación separadas en un gel de agarosa con el programa de análisis de imagen multi Gauge, estableciendo una relación porcentual entre ellas que debía sumar 100 %. En todos los casos, la amplificación doble del alelo silvestre (S) y el alelo con la inserción del transposon (T) dio lugar a una banda de amplificación intermedia (A) (Figura 35.B), que fue considerada un artefacto tras realizar una PCR control sobre una mezcla artificial de ADNs genómicos de la cepa silvestre y de un aislado monospórico con la inserción, produciéndose nuevamente la banda A.

Con el fin de calibrar correctamente la relación entre las dos bandas de amplificación T y S, teniendo en cuenta la menor eficiencia de la banda con mayor peso molecular T frente a la de menor peso molecular S, se generó una curva patrón con mezclas de ADN genómico de wt y un aislado monospórico con la

inserción, en nueve proporciones conocidas de ambos alelos desde 0,1:0,9 a 0,9:0,1 (Figura 35.B). El valor final de la frecuencia alélica en las poblaciones se obtuvo aplicando el factor de corrección deducido de la curva patrón a los datos cuantitativos obtenidos sobre los dos productos de PCR.

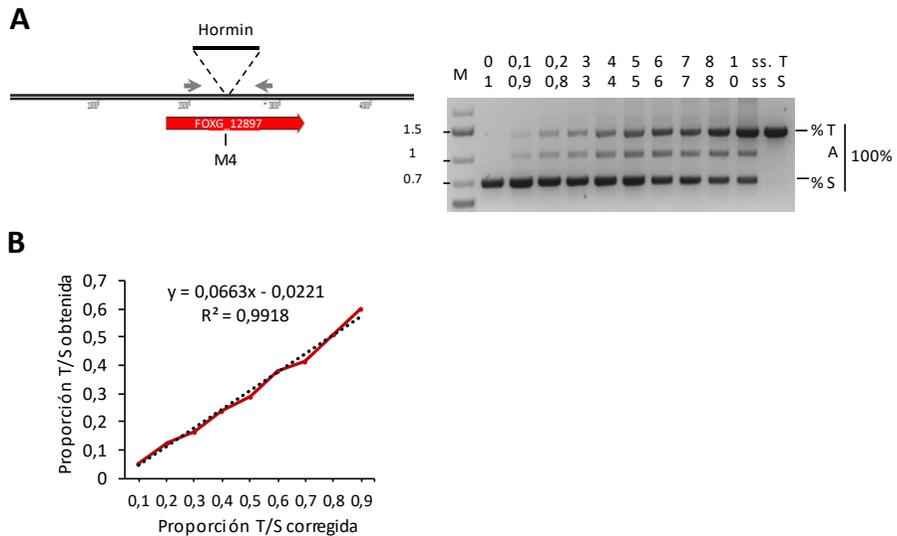


Figura 35. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas en la población de las inserciones por transposones. (A) Se realizó una PCR sobre ADN genómico de la población con una pareja de oligonucleótidos que flanquean la inserción. La banda de mayor peso molecular corresponde a la inserción del transposón (T) y la de menor peso molecular al alelo silvestre (S). En todos los casos se observó una banda adicional de tamaño intermedio que se consideró un artefacto (A). Para calcular el factor de corrección, se midieron las intensidades de las bandas T y S obtenidas a partir de mezclas de ADN del alelo silvestre y del alelo con transposón, a proporciones conocidas de 0,1:0,9 a 0,9:0,1. M, marcadores de peso molecular. (B) Ejemplo de curva patrón utilizada para calcular el factor de corrección. El valor final de la frecuencia alélica se obtuvo aplicando al valor inicial de cada muestra el factor de corrección obtenido en la curva patrón.

20.7.2. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas para los SNPs.

La cuantificación de las frecuencias de SNPs se realizó mediante análisis RFLP. Tras confirmar el SNP en la secuencia con los datos de alineamiento y la herramienta de visualización VCF, se utilizó el programa Snap Gene para buscar

enzimas de restricción sensibles al SNP (ver tabla). Tras confirmar la funcionalidad del RFLP se diseñó una pareja de oligonucleótidos que flanquean el SNP, teniendo en cuenta que los tamaños de las bandas obtenidas sin y con corte de enzima tenían que ser lo suficientemente diferentes para permitir una buena separación en gel de agarosa. Las intensidades de las distintas bandas se midieron con el programa multi Gauge. Como control se comparó la frecuencia obtenida para la población del pasaje 10 con el dato calculado a partir de las lecturas de secuenciación, obteniéndose generalmente valores muy similares.

La necesidad de utilizar RFLPs solo permitió rastrear aquellos SNPs que tuvieron un efecto diferencial sobre alguna de las enzimas de restricción disponibles comercialmente.

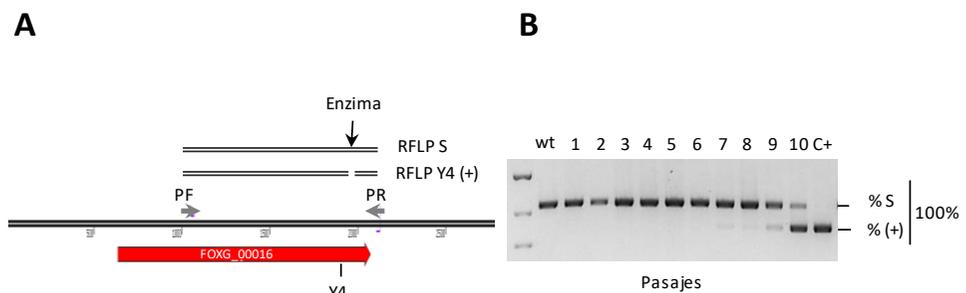


Figura 36. Método para el cálculo de las frecuencias alélicas de los SNPs mediante la técnica RFLP. (A) La presencia del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se detectó mediante PCR, cuyo producto de amplificación se sometió a tratamiento con una enzima de restricción que resultara en presencia o ausencia de corte, dependiendo del SNP, entre la cepa silvestre (S) y el aislado mutado (+), quedándose reflejado en una diferencia de tamaño de las bandas obtenidas (RFLP). **(B)** Para cuantificar la frecuencia alélica en cada una de las poblaciones se midió la intensidad de cada banda con el programa multi Gauge V3.0, calculando así los porcentajes relativos. Como control se utilizó ADN de la cepa silvestre y de un aislado monospórico portador del SNP. En todos los casos se comparó el resultado obtenido con el RFLP con el de la secuenciación de la población del pasaje 10.

20.7.3. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en plantas.

Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos en las distintas líneas se muestra, además del gráfico completo, los gráficos individuales para cada tipo de evento: transposones, SNPs e Indels.

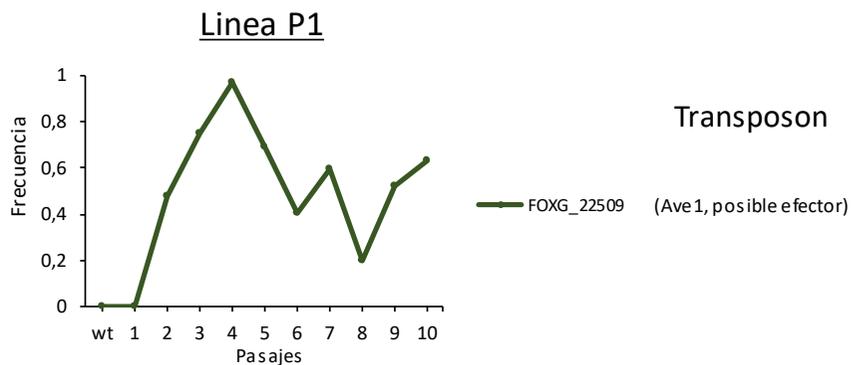


Figura 37. Dinámica evolutiva de los eventos indicados a lo largo de la evolución experimental en la línea P1. El gráfico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua.

En la línea P1 (Figura 37) solo se realizó el seguimiento de un único evento, la inserción del transposon no-autónomo hormin aguas arriba del gen FOXG_22509. Este gen se ha identificado como un importante efector de virulencia fúngica en *Verticillium dahliae* (de Jonge, *et al* 2012).

Este evento se detecta por primera vez en el pasaje 2 con una frecuencia del 50 %, llega al 100 % de manera transitoria en el pasaje 4, para luego bajar en los siguientes pasajes sin volver a fijarse nuevamente.

La figura 38 muestra el resultado del análisis en la población P2, primero en una gráfica donde están todos los eventos rastreados, y posteriormente desglosado en tres graficas adicionales que solo muestran las inserciones de

transposones, los SNPs y los Indels. En la figura 38.A se aprecia como los distintos eventos presentan un efecto en cascada, donde van sucediéndose una tras otra las mutaciones, de manera que la siguiente aparece cuando la anterior está fijada o está a punto de hacerlo. La separación en distintas gráficas según tipo de evento permite apreciar aspectos tan interesantes como dos eventos coincidentes que muestran la misma dinámica evolutiva. Este es el caso de la inserción del transposon *Fot5* aguas arriba del gen *FOXG_15821* (Figura 38.B) que coincide totalmente con la dinámica de una delección de 20 nucleótidos en el *conting U_45*. (Figura 38.D)

La segunda mutación detectada, por orden cronológico, fue un SNP en la CDS del gen *FOXG_10196*, que provoca un cambio de aminoácido (D12E) en la proteína. Esta segunda mutación también se fijó en un solo pasaje. La siguiente, un SNP que introduce un codón de parada en la CDS del gen *FOXG_11096* responsable de una enzima pectato liasa, necesitó dos pasajes más para fijarse. Finalmente, la última mutación analizada se debe a la inserción del transposon *hormin* en la CDS del gen *FOXG_08732* que codifica una proteína con dominio NAD(P)-binding, muestra una dinámica de fijación parecida a la anterior.

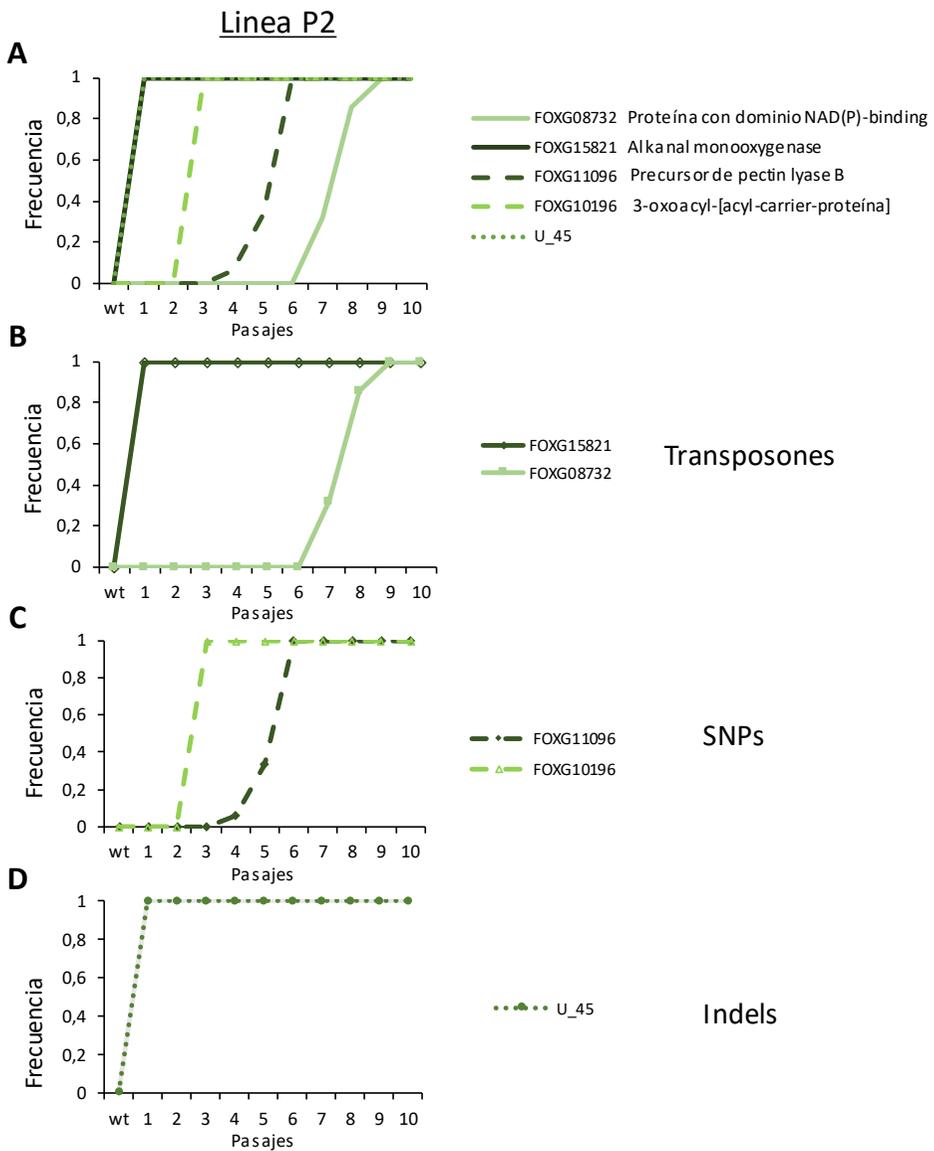


Figura 38. Dinámica evolutiva de los eventos indicados a lo largo de la evolución experimental en la línea P2. El grafico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua y las Indels con punteada. (A) Resumen de todos los eventos monitorizados. (B-D) Desglose según tipo de evento.

En la línea P4 se observa la dinámica evolutiva de tres inserciones de transposones a lo largo de los 10 pasajes (Figura 39). La primera inserción se produjo en el promotor del gen FOXG_06466 responsable de la síntesis del fosfoenolpiruvato, y se detectó a partir del pasaje 5 con una frecuencia alélica en torno al 30%. En el siguiente pasaje, la frecuencia de este evento tuvo un ligero retroceso que coincide con la aparición de la segunda inserción del transposón hormin en la región intergénica entre los genes FOXG_02937 y FOXG_18438, de manera que podría afectar uno de ellos o ambos. Esta segunda mutación terminó fijándose en la población, mientras que la primera retrocedió al 10 % para luego volver a subir hasta el 40 % en el pasaje 10 donde se detectó, además, una tercera inserción producida por el transposon hormin y localizada dentro de la CDS del gen FOXG_22586 que codifica un factor de transcripción.

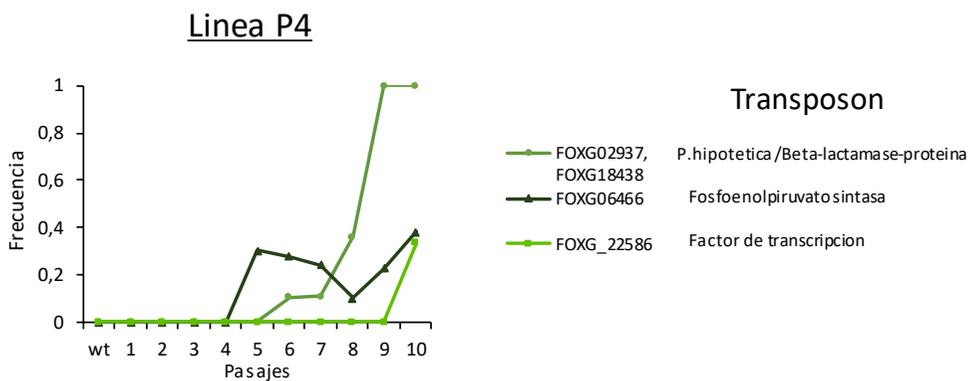


Figura 39. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P4. El gráfico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua.

En la línea P5 se observaron cuatro eventos con la misma dinámica de fijación en el primer pasaje, con una pequeña variación en el pasaje 4 que no condicionó, sin embargo, que en el resto de los pasajes los cuatro eventos se mantuvieran estables en el 100 % de la población. Tres de los eventos corresponden a inserciones independientes del mismo transposon, hormin, en

los genes FOXG_ 22266 (CDS, supuesta Cupredoxina), FOXG_12102 (Intrón, supuesta feruloyl esterasa) y FOXG_04683 (CDS, proteína hipotética) (Figura 40.B). El mismo patrón se observó en un Indel en el gen FOXG_22360 (Figura 40.D). El resto de las mutaciones analizadas se detectaron a partir del pasaje 5, donde se observa una inserción del transposon Hat1 en la zona 3'-UTR del gen FOXG_08909 (supuesta proteína transportadora) que se fijó en el pasaje 8. La siguiente mutación fue una delección de 38 kb, flanqueada por dos secuencias repetidas, en el cromosoma 14 que supone la pérdida de 13 genes y de la se hablará en detalle más adelante. Finalmente, las dos últimas mutaciones analizadas en P5 fueron sendos SNPs en los genes FOXG_11967 (CDS de una supuesta péptido sintasa no-ribosomal con cambio de aminoácido C741F y FOXG_07021 (región promotora de transposon Pogo). La primera de ellas se fija rápidamente mientras la segunda aparece en más del 60 % de la población del último pasaje.

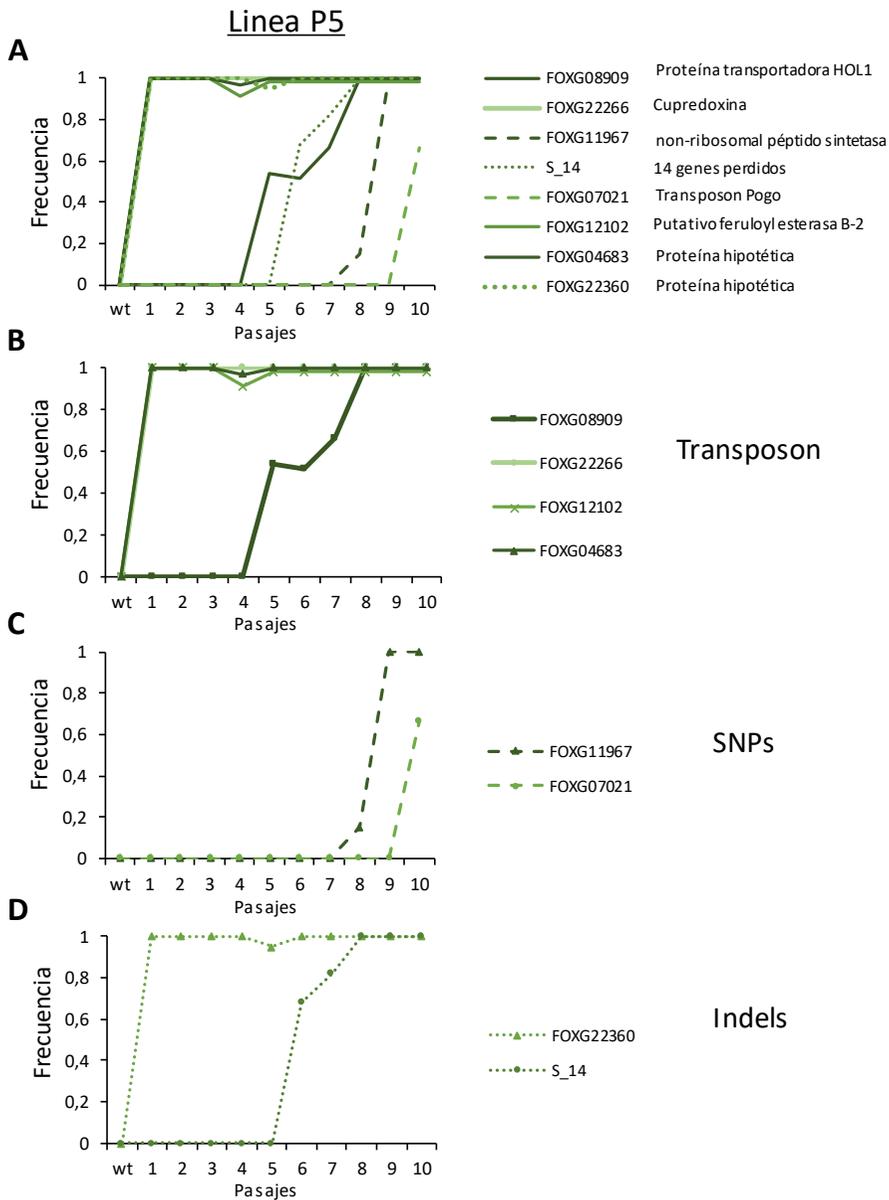


Figura 40. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P5. El grafico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua y las Indels con punteada.

En la línea P3 se identificaron varios eventos idénticos a los de P5, lo que resultó sospechoso. Un análisis detallado sugiere que este fenómeno se debe a una mezcla accidental de las dos líneas en el pasaje 5. Como puede observarse, a partir del pasaje 5 se detectan las cuatro mutaciones descritas también en P5 con frecuencias que oscilan entre el 40-60% dependiendo del evento, manteniendo esa proporción casi estable hasta el final del experimento (Figura 41). Esto sugiere que tras la mezcla en el pasaje 5, las dos poblaciones P3 y P5 coexistieron en aparente equilibrio. Por otro lado, el resto de los eventos estudiados en esta línea mezclada, todos ellos posteriores a la mezcla, ninguno llegó a fijarse. De todas ellas, dos surgieron tras el pasaje 5, un SNP en la región 3' UTR de FOXG_00985 y una deleción de 28 kb en el cromosoma 7 que supone la pérdida de 12 genes. Se produjeron en el fondo genético de la línea P3 y P5 respectivamente. Finalmente, la última mutación analizada fue un SNP aguas abajo del gen FOXG_19617, que se produjo en el fondo genético de la línea P3. Esta conclusión se dedujo del análisis molecular de las mutaciones en los aislados monospóricos obtenidos a partir de la población 10, que se presenta en el capítulo 4 (Ver también ANEXO II).

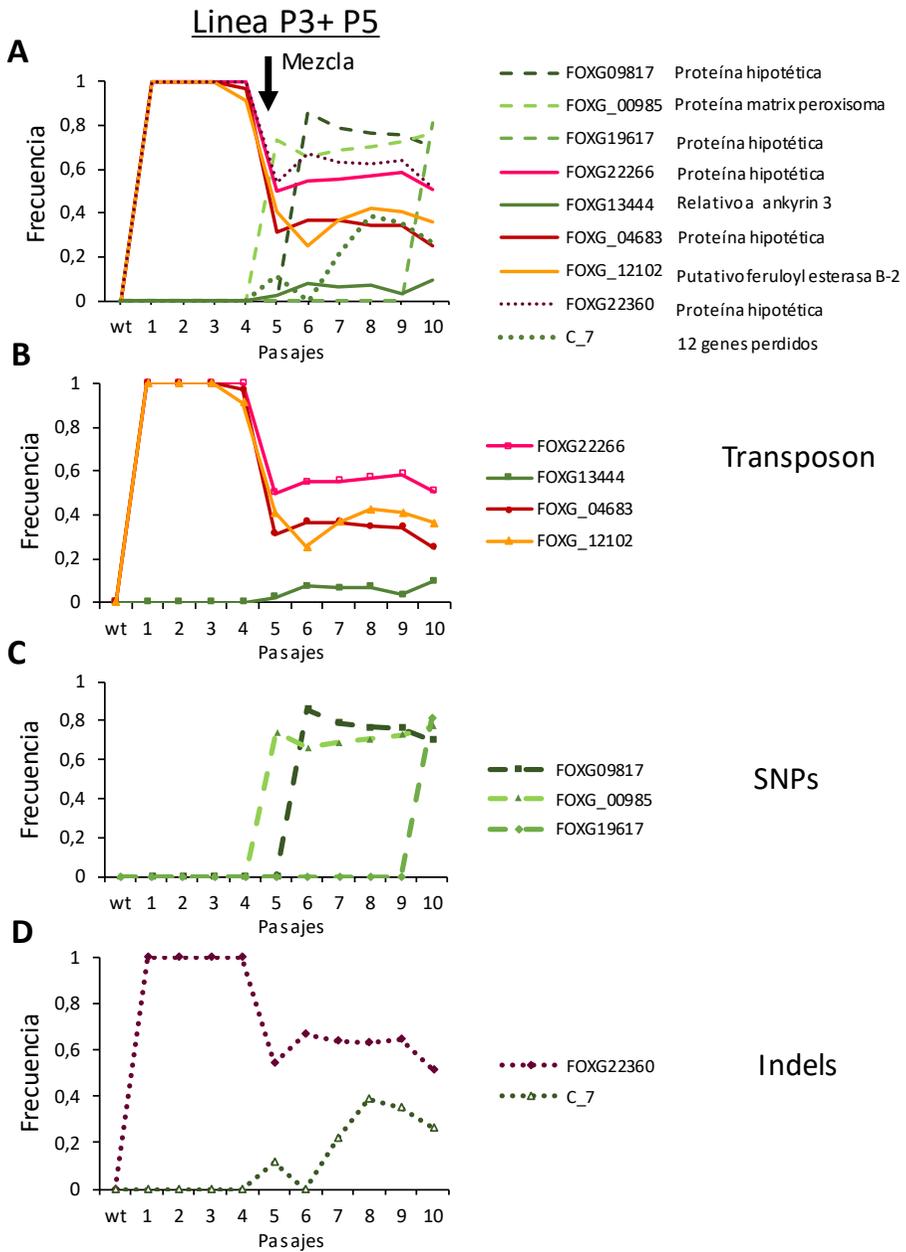


Figura 41. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea P3. El grafico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua y las Indels con punteada.

Tanto en la línea P3 como en la P5 se identificaron dos deleciones relativamente grandes cuya particularidad es la de estar flanqueadas por las mismas secuencias repetidas con homología a un transposon. En el último pasaje de la línea P3 se detectó una bajada en el número de lecturas alineadas cerca del final del cromosoma 7 (Figura 42.A). Un análisis en detalle de la región determinó que se trataba de una deleción de 28 kb que suponía la pérdida de 12 genes, flanqueada por copias del transposon FOXY de 660 pb (Figura 42.C). El estudio de la dinámica evolutiva del evento se realizó en dos pasos. Primero se comprobó la existencia de la deleción mediante una PCR con una pareja de oligonucleótidos que flanquean la secuencia delecionada, que produce amplificación solo si la secuencia de 28 kb no está. El análisis de la población del último pasaje y de algunos aislados monospóricos obtenidos a partir de esta dió positivo para la deleción, con el producto de amplificación esperado de 911pb de lo que se deduce además la pérdida de una de las dos copias de Foxy. El segundo paso fue la cuantificación de la frecuencia a través de una qPCR con oligonucleótidos diseñados dentro de la deleción, normalizando respecto a la cepa wt y utilizando el gen de la actina como referencia. Se determinó que la deleción se produjo en el pasaje 5 de la línea P3 y no llegó a fijarse hasta el pasaje 10, donde solo alcanzó el 30% (Figura 42.B)

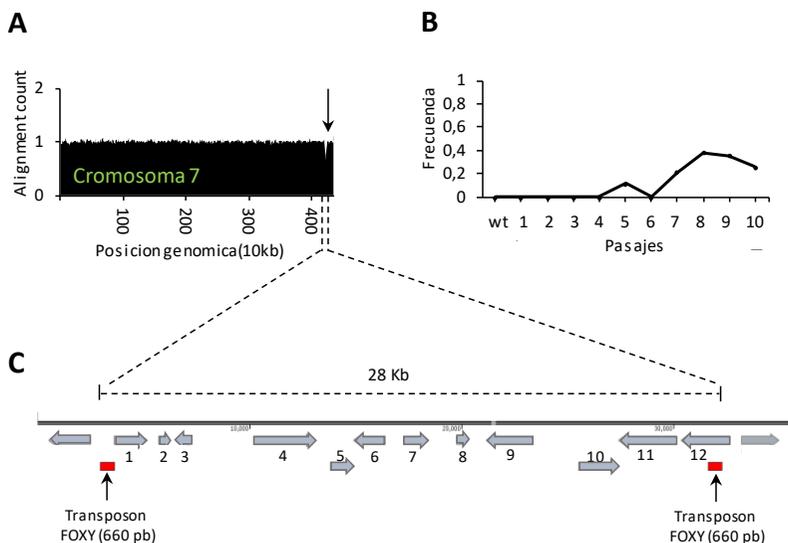


Figura 42. Dinámica evolutiva de la delección de 28 Kb en el cromosoma 7 en la línea mezclada P3+P5. (A) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición del cromosoma 7 encontradas tras el pasaje 10 en la población mezclada P3+P5 relativo al wt. (B) El grafico muestra la frecuencia del Indel en la población a lo largo de los diez pasajes, calculada a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina. (C) Mapa de la región delecionada de 28 kb, flanqueada por dos secuencias del transposón FOXY.

Los genes contenidos en la región delecionada se analizaron mediante blastp para estudiar su homología con proteínas en la base de datos NCBI. Entre ellos se encontró un gen supuestamente relacionado con la producción de etileno (FOXG_10772).

Tabla 20. Se muestran los genes eliminados en la delección.

	Gen	Función
1	FOXG_10772	1 amino ciclopropane carboxile oxidase (etileno)
2	FOXG_20369	Proteína hipotética
3	FOXG_10773	Proteína hipotética
4	FOXG_10774	Proteína hipotética
5	FOXG_10775	Proteína hipotética
6	FOXG_10776	Chaperona mitocondrial (parcial)
7	FOXG_20370	ADP-ribosylation (muy parcial)
8	FOXG_10777	poliketido ciclasa
9	FOXG_10778	MFS transporter, general alpha glucoside:H+
10	FOXG_10779	Amino acid permeasa

	Gen	Función
11	FOXG_20371	Proteína Putative regulador transcripcional
12	FOXG_10782	Alcohol dehidrogenasa

El otro gran indel se detectó en la línea P5 y en el cromosoma 14. La bajada de lectura alineadas en una zona intermedia permitió detectar la deleción de 38 Kb flanqueada por el transposon hAt-1 y provocó la pérdida de 14 genes (Figura 43.A y C). En este caso la dinámica evolutiva estudiada por el mismo método de qPCR empleado en la deleción anterior, permitió encontrar el inicio del evento entre el pasaje 5 y 6 de la evolución experimental. La frecuencia de inicio encontrada correspondió a un valor cercano al 70% de la población que alcanzó el 100% en dos pasajes más mantenido hasta el final de la evolución experimental.

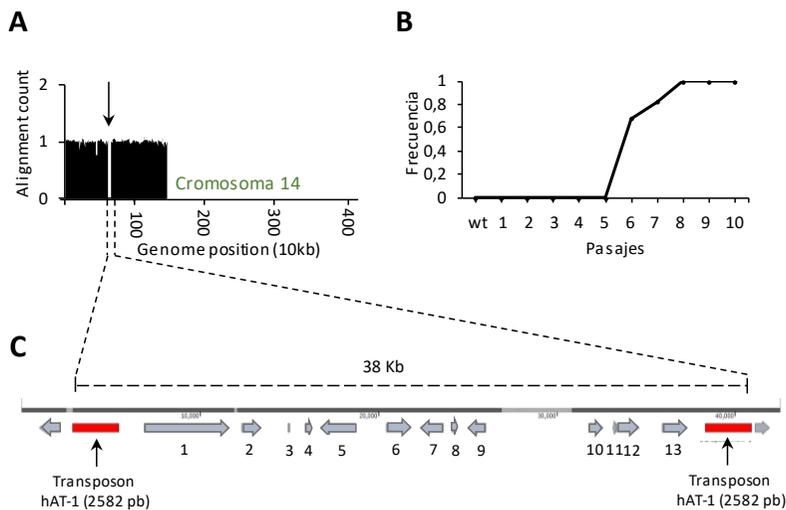


Figura 43. Dinámica evolutiva de la deleción de 38 Kb en el cromosoma 7 seleccionada en la línea mezclada P3+P5. (A) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición del cromosoma 7 encontradas tras el pasaje 10 en la población mezclada P3+P5 relativo al wt. (B) El grafico muestra la frecuencia del Indel en la población detectado a través qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina. (C) Mapa de la región delecionada de 28 kb, flanqueada por dos secuencias del transposón FOXY.

Dentro de los genes perdidos por la delección nuevamente se ha encontrado una copia parcial de un gen completo ubicado en otra zona del genoma (FOXG_14296), el resto de las funciones de los genes delecionados no parece tener relación directa con la infección de plantas, aunque más de la mitad de ellos se desconoce el papel que desempeñan.

Tabla 21. Se muestran los genes eliminados en la delección.

	Gen	Función
1	FOXG_14292	Papel en metabolismo de nucleósidos
2	FOXG_21551	Proteína quinasa
3	FOXG_21552	Proteína hipotética
4	FOXG_14293	Regulador transcripcional Pro1A (parcial)
5	FOXG_14294	Serina/threonina proteína quinasa
6	FOXG_14295	Proteína hipotética
7	FOXG_21552	Proteína hipotética
8	FOXG_21553	Proteína hipotética
9	FOXG_21554	Proteína hipotética
10	FOXG_14296	F-box domain
11	FOXG_14297	Proteína tipo Speckle
12	FOXG_21555	Proteína hipotética
13	FOXG_14298	Proteína hipotética
14	FOXG_14299	Proteína hipotética

20.7.4. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en medio mínimo

Como ya se ha mencionado antes, el medio mínimo fue la condición donde menos cambios en el genoma se fijaron en las líneas evolucionadas. En la figura 44 se representa la dinámica de algunos de los eventos encontrados en cuatro de las cinco líneas, ya que M2 fue la única población en la que no se detectó ningún cambio.

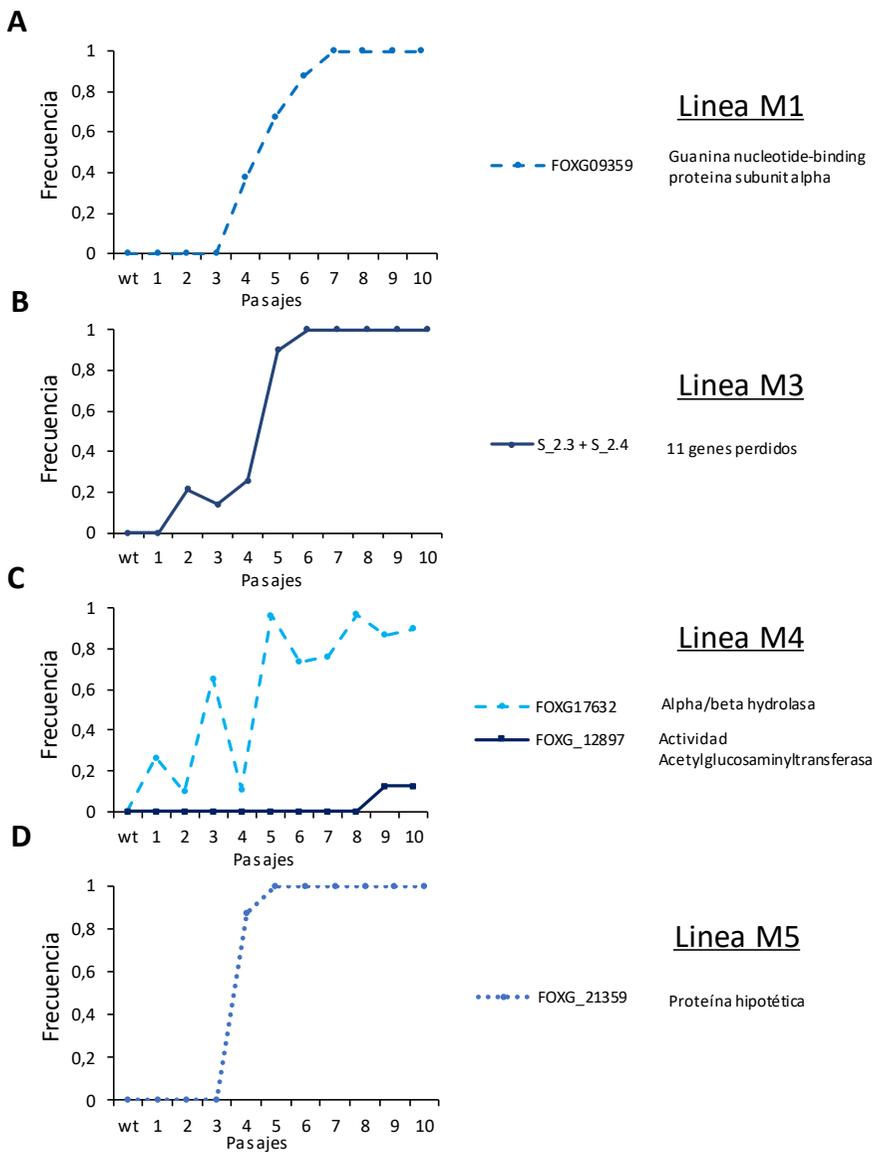


Figura 44. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en las poblaciones evolucionadas en medio mínimo. El gráfico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua y las Indels con punteada.

En M1 se realizó el seguimiento de un SNP localizado dentro de la CDS del gen FOXG_09359, resultando en el cambio de aminoácido C187T. Este evento se fijó de manera progresiva a través de cuatro pasajes (4-7). En M3 se observó una delección, identificada según en dos *contigs* distintos (S_2.3 y S_2.4). El análisis por PCR con dos oligonucleótidos específicos permitió establecer que ambos eran consecutivos, al producirse una amplificación de un fragmento corto de un tamaño de 3000 pb en los aislados monospóricos portadores de la delección (frente a una hipotética banda de >35.000 pb en la cepa silvestre, Figura 45). Por tanto, nuevamente se trataría de una delección grande flanqueado por dos copias de un transposon, en este caso *hormin* (732pb), que provoca la eliminación de 11 genes. El estudio de dinámica evolutiva permitió ver una rápida fijación en la población. Los genes eliminados junto con la supuesta función de las proteínas se detallan en la tabla 22.

En la línea M4 se realizó el seguimiento de dos eventos. El primero corresponde a un SNP localizado aguas abajo del gen FOXG_17632 que muestra una dinámica aleatoria en los primeros pasajes para luego fijarse, mientras que el segundo corresponde a la inserción del transposon *hormin* en la CDS del gen FOXG_12897 que se detectó en los dos últimos dos pasajes con una frecuencia muy baja en torno al 10 %. Finalmente, en la línea M5 se observó la rápida fijación de una delección de 52pb que crea un codón de parada en la CDS del gen FOXG_20948.

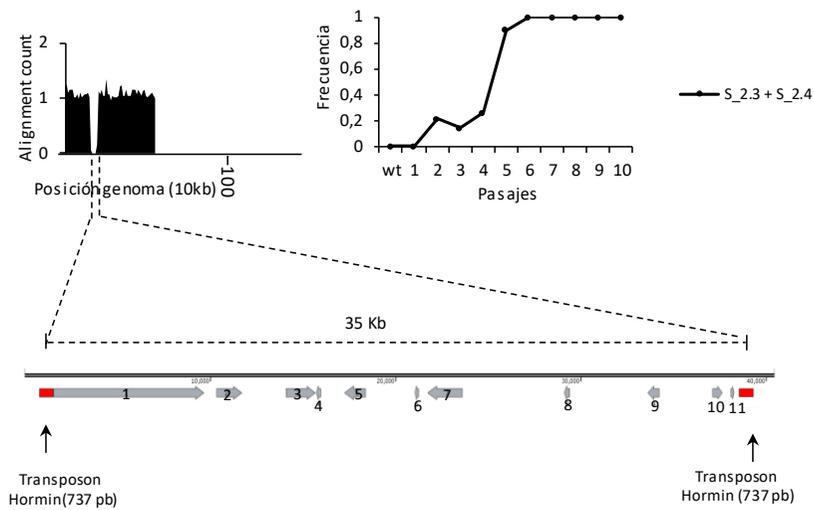


Figura 45. Dinámica evolutiva de la deleción de 35 Kb seleccionada en la línea M3. (Panel izquierdo) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición de S-2.3+S_2.4 encontradas tras el pasaje 10 en la población mezclada M3 relativo al wt. (panel derecho) El grafico muestra la frecuencia de la deleción en la población a lo largo de los diez pasajes, calculada qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina. Mapa de la región delecionada de 35 kb, flanqueada por dos secuencias del transposón Hormin.

Tabla 22. Se muestran los genes eliminados en la deleción

Gen	Función
1	FOXG_15886 Compactin diketide synthase mokB
2	FOXG_15887 Proteína hipotética
3	FOXG_22249 beta-lactamasa
4	FOXG_22250 transposasa
5	FOXG_15890 Proteína hipotética
6	FOXG_22251 Proteína hipotética
7	FOXG_15891 Proteína hipotética
8	FOXG_22252 Proteína hipotética
9	FOXG_22253 Proteína hipotética
10	FOXG_15895 histona acetiltransferasa
11	FOXG_15896 histona acetiltransferasa

20.7.1. Seguimiento de la dinámica de las inserciones de transposones, SNPs e Indels en las líneas evolucionadas en medio completo

Durante la evolución experimental en medio completo se observaron claros cambios de crecimiento, color y conidiación que diferenciaban a las cinco líneas en dos grupos fenotípicos. El análisis de secuenciación confirmó la existencia de estos dos grupos al detectarse mutaciones coincidentes en las líneas Y2, Y3, Y4 e Y5, pero no en Y1.

En la línea Y1 se hizo el seguimiento de dos cambios, una inserción del transposon hormin en la CDS de FOXG_14157 y un SNP aguas abajo de FOXG_09993 (Figura 46). Ambos eventos se produjeron posteriormente al pasaje 5 y no llegaron a fijarse en la población al quedarse en una frecuencia alrededor del 50 % tras el pasaje 10.

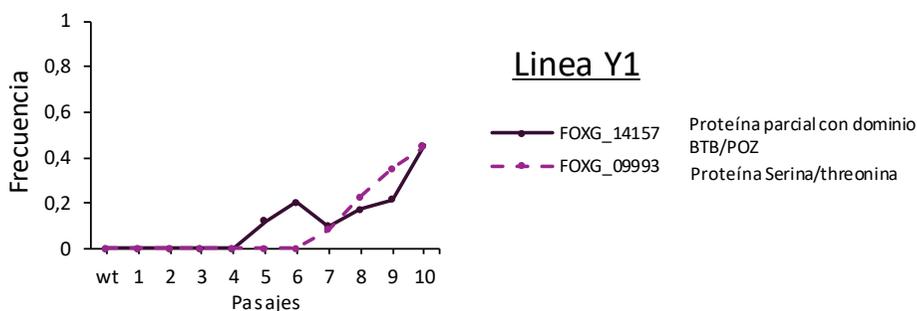


Figura 46. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en la línea Y1. El gráfico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua.

En las otras cuatro líneas se detectó una inserción del transposon hormin en distintos sitios del gen FOXG_21009 (Figura 49). En los cuatro casos, el evento surgió en los primeros pasajes de la evolución, entre Y3 e Y5 (Figura 47). Mientras en tres de las cuatro líneas se fijó rápidamente en la población, con grandes incrementos en la frecuencia de un pasaje a otro, en Y5 mantuvo a un porcentaje más o menos constante en torno al 20 % a lo largo del experimento.

Resulta interesante que en tres de las líneas con el fondo genético de la inserción hormin en FOXG_21009 (Y2, Y3 e Y4), apareció posteriormente una segunda mutación en otro gen, FOXG_00016, que codifica la proteína velB. En dos de las líneas, Y3 e Y4, se trata de un SNP en la CDS, mientras que en Y2 se trata de una pequeña delección, aunque en los tres casos se genera un codón de parada prematuro resultando en una proteína truncada. En la Figura 47 se muestra la dinámica de los eventos en las líneas Y2 e Y4. No existe coincidencia en el modo de fijación entre ambas líneas, ya que en la línea Y2 surge en el pasaje 6 pero con incrementos en la frecuencia en los siguientes pasajes más o menos constantes, mientras que en Y4 surge en el pasaje 7, pero no es hasta el último pasaje cuando el incremento es más significativo. En ambos casos las frecuencias en la población final son cercanas al 80 %.

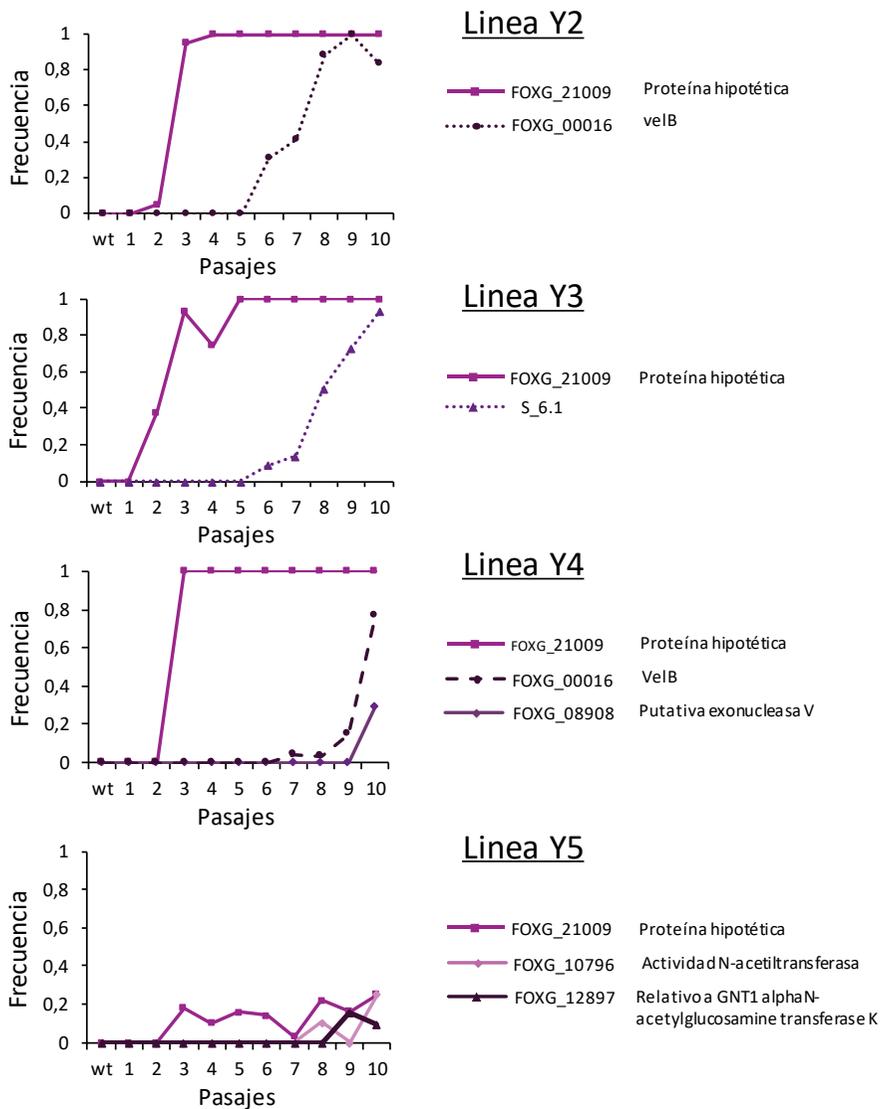


Figura 47. Dinámica evolutiva de algunas de las mutaciones identificadas en las líneas Y2-Y5. El grafico muestra la frecuencia de cada evento en la población a lo largo de los diez pasajes. Las mutaciones por inserción de transposones están representadas con línea continua, los SNPs con discontinua y las Indels con punteada.

Otro evento analizado fue una delección en la región cromosómica S_6 & S_3 de la línea Y3, donde se observó una bajada de lecturas de frecuencia similar en ambos cromosomas (Figura 48.A). Para confirmar una posible relación entre

ambas, se realizó una PCR múltiple con tres parejas de oligonucleótidos específicos localizados en las regiones afectadas por la delección en S_3 & S_6, junto con una pareja de oligonucleótidos control (C+) de una zona no delecionada. El análisis por PCR se realizó sobre ADN de aislados monospóricos obtenidos a partir de la población del pasaje 10 de la línea Y3. En 6 de los 10 aislados analizados se habían perdido conjuntamente las dos regiones localizadas en S_3 & S_6, mientras que en los otros 4 aislados la región era idéntica a wt. Este resultado confirma que ambas delecciones están localizadas en la misma región y corresponden a uno de los dos cromosomas (Figura 48.B). Como puede verse en la figura 48.C, la delección surgió en el pasaje 6 con una baja frecuencia y alcanzó el 100% de la población en los últimos tres pasajes.

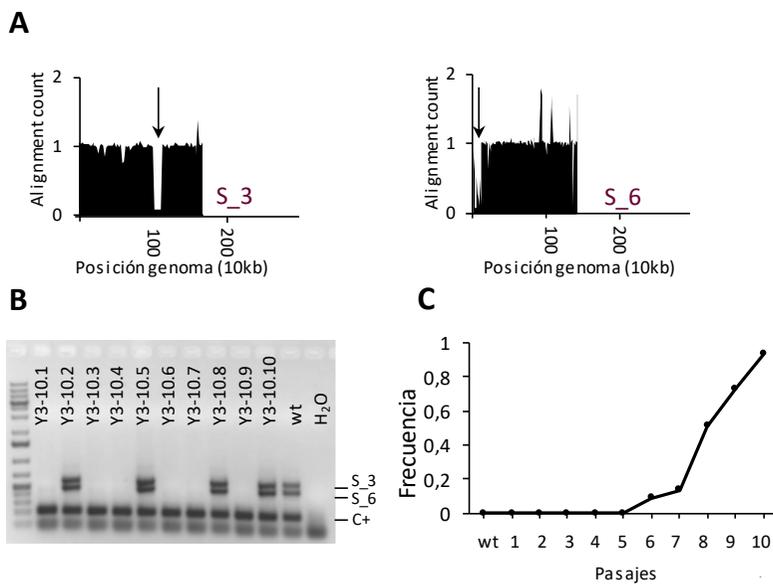


Figura 48. Dinámica evolutiva de la doble delección en los cromosomas parciales S_3 y S_6 seleccionada en la línea Y3. (A) La graficas de alineamiento muestran el número de lecturas en cada posición de S_3 y S_6 encontradas tras el pasaje 10 en la población Y3 relativo al wt. (B) PCR múltiple de aislados monospóricos obtenidos de la población 10 y la línea Y3 realizada con oligonucleótidos específicos para las zonas S_3, S_6 y C+(PCR en zona no delecionada) (C) El grafico muestra la frecuencia de la delección en la población a lo largo de los diez pasajes, determinada por qPCR con oligonucleótidos específicos. Los datos se normalizaron respecto al wt, tomando como referencia el gen de copia única actina.

Debido a la aparición independiente de sendos eventos en los genes FOXG_21009 y FOXG_00016 en múltiples poblaciones evolucionadas en medio completo, se realizó un esquema con las posiciones de inserción de hormin en FOXG_21009 y de los SNPs/indels en FOXG_00016, así como del tamaño de las supuestas proteínas resultantes (Figura 49).

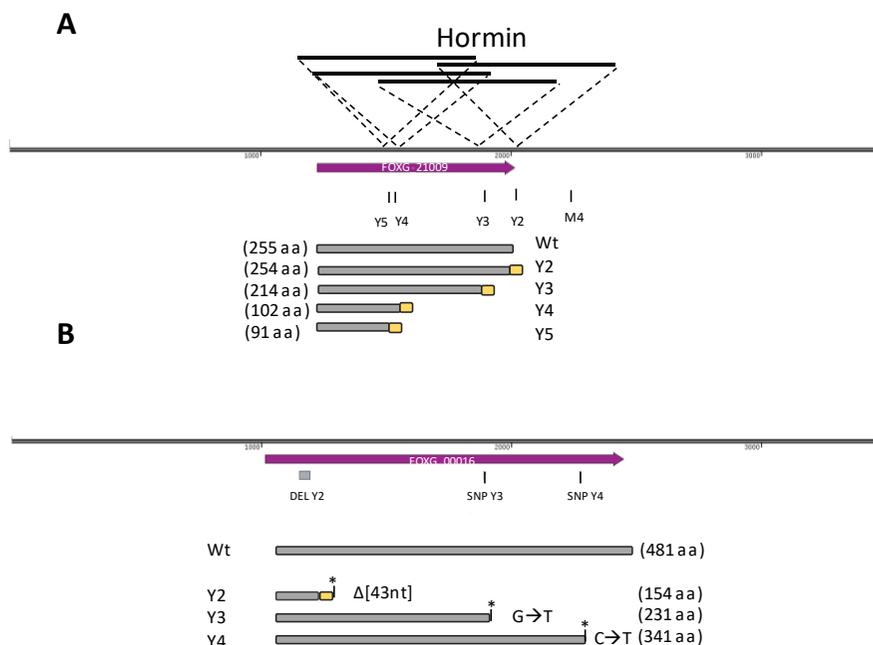


Figura 49. Eventos detectados en los genes FOXG_21009 y FOXG_00016 en distintas líneas evolucionadas en medio completo. (A) Inserciones independientes del transposón hormin en el gen FOXG_21009 en las líneas Y2, Y3 Y4 e Y5 evolucionadas en YPGA e inserción del transposón hAT1 en la línea M4 evolucionada en MM. **(B)** Mutaciones en el gen FOXG_00016 (*ve/B*) que consisten en sendos SNPs en Y3 e Y4 y una deleción de 43 pb en Y2. En todos los casos se genera un codón stop prematuro resultando en una proteína trunca.

El gen FOXG_21009 se localiza en el contig U9 que no está asignado a ningún cromosoma (ver anexo I). La proteína deducida contiene 243 aa y su secuencia génica no se encuentra interrumpida por intrones. La búsqueda en la base de datos mediante análisis Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando la secuencia de aminoácidos no arrojó homología con ninguna proteína

con función conocida por lo que fue catalogada como proteína hipotética. El número de líneas evolucionadas independientes con eventos en este gen fue de cinco, cuatro en medio completo y una en medio mínimo. La inserción del transposon hormin en las líneas Y2, Y3, Y4 e Y5 se produjo en distintas localizaciones de la fase abierta de lectura (ORF), mientras que en la línea M4 fue producida por otro transposon, hAT1 en la zona del terminador a 100 pb aguas abajo del codón de parada.

El gen FOXG_00016 está localizado en el cromosoma 1 y codifica una proteína conocida, denominada VelB cuyo tamaño es de 481 aa, y que forma parte del complejo regulador Velvet (Bayram *et al*, 2008). El número de líneas portadoras de mutaciones en *velB* fue de tres, Y2, Y3, e Y4. En Y3 e Y4, sendos SNPs originaron codones de parada, generando así proteínas truncadas de 341 y 231 aa, respectivamente, comparado con los 481 aa del wt, lo que supone una pérdida del 30 y del 52 % del tamaño total, respectivamente. En Y2 se produjo una deleción de 43 nucleótidos con el mismo efecto de proteína truncada que en las líneas anteriores.

20.8. Efecto de las de las mutaciones seleccionadas sobre la "fitness" de *F. oxysporum*

20.8.1. Generación de mutantes *knockout* en el gen FOXG_21009

Con el fin de conocer el papel biológico de la proteína codificada por el gen FOXG_21009 en *F. oxysporum*, se crearon mutantes de deleción ($\Delta 21009$) mediante la transformación de protoplastos de la cepa silvestre con una construcción en la que se había reemplazado la CDS del gen (ORF) por el casete de resistencia a higromicina (Figura 50.A). Entre los transformantes resistente a higromicina obtenidos, dos resultaron ser positivos según sendas amplificaciones por PCR sobre el ADN genómico con oligonucleótidos localizados dentro del

casete Hyg^R (Hyg-G , Hyg-Y) y otro en cada región flanqueante a la ORF, tanto -5' (U9genTR) como -3' (U9genP2), que produjeron fragmentos con los tamaños esperados de aproximadamente 1,9 kb y 1,8 kb, respectivamente (Figura 50.B). Posteriormente se verificó el *knockout* de FOXG_21009 mediante análisis Southern del ADN genómico de los transformantes sometido a tratamiento con la enzima de restricción EcoRI . La hibridación de la sonda en la zona del terminador del gen permitió distinguir dos tamaños distintos de bandas de hibridación, una de 4,2 kb en la estirpe silvestre y otra de 2,4 kb para los mutantes nulos, confirmando a ambos candidatos como positivos (Figura 50.C).

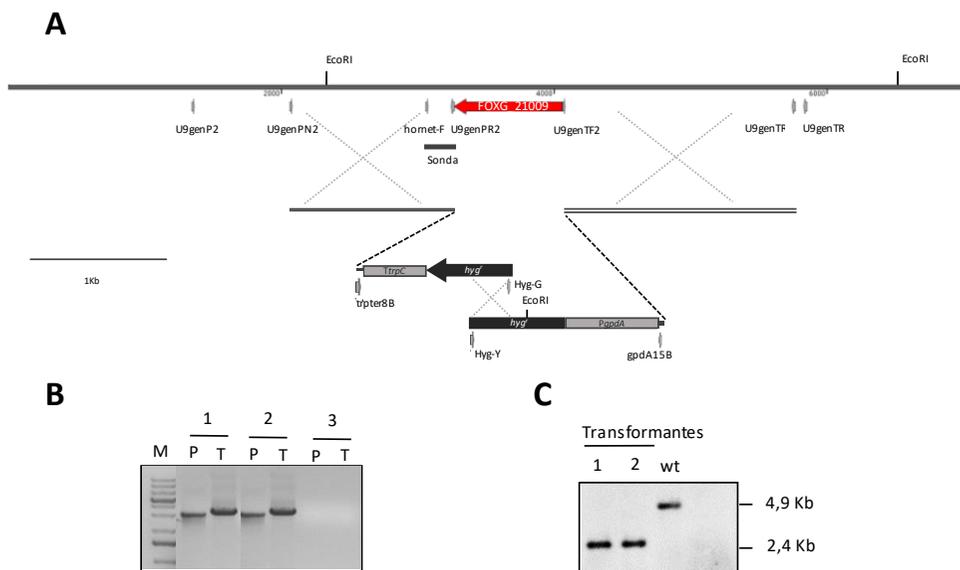


Figura 50. Delección dirigida del gen FOXG_21009 en *F. oxysporum*. (A). Representación esquemática del locus FOXG_21009 y del casete de interrupción con el marcador seleccionable de resistencia a higromicina obtenido mediante la técnica de Split Marker. (B) Análisis de los transformantes por PCR con los cebadores específicos U9genPN2 (externo a la construcción en 5') y Hyg-G (casete higromicina). La banda de amplificación indica el suceso de interrupción por recombinación homóloga. (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; el ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con la enzima EcoRI , separado en un gel de 0,7% de agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada en (A). Los tamaños de las bandas de hibridación correspondientes al alelo silvestre y al alelo nulo están indicados.

20.8.1. Generación de mutantes *knockout* en el gen *velB*

Del mismo modo que para el gen anterior, se decidió crear mutantes nulos en el gen FOXG_00016 que codifica la proteína VelB en *F. oxysporum*. Se transformaron protoplastos de la cepa silvestre con una construcción en la que se había reemplazado la fase abierta de lectura del gen por el casete de resistencia a higromicina (Figura 51.A). Entre los transformantes resistentes a higromicina, seis resultaron ser positivos según sendas amplificaciones por PCR sobre el ADN genómico con oligonucleótidos localizados dentro del casete Hyg^R (Hyg-G, Hyg-Y) y otro dentro cada región flanqueante a la ORF, tanto -5' (velBPF) como -3' (velBTR), produciendo fragmentos de los tamaños esperados de aproximadamente 1,4 kb y 1,5 kb, respectivamente (figura 51.B). Posteriormente se verificó el knockout de FOXG_00016 mediante análisis Southern del ADN genómico de los transformantes sometido a tratamiento con la enzima de restricción NcoI. La hibridación de la sonda en la zona del terminador del gen permitió distinguir dos tamaños distintos de bandas de hibridación, una de 4,4 kb en la estirpe silvestre y otra de 3,2 kb en los mutantes nulos, confirmándose a ambos candidatos como positivos (Figura 51.C).

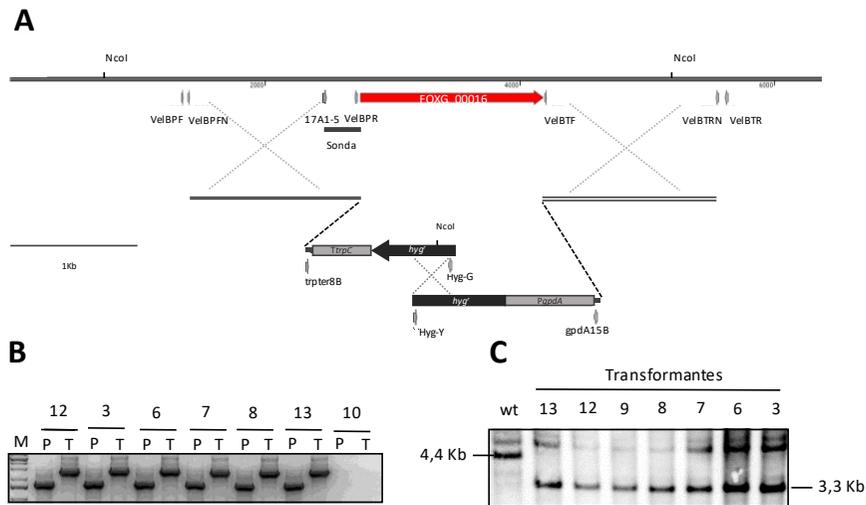


Figura 51. Delección dirigida del gen *velB* (FOXG_00016) en *F. oxysporum*. (A). Representación esquemática del locus *velB* y del casete de interrupción con el marcador seleccionable de resistencia a higromicina obtenido mediante la técnica de Split Marker. **(B)** Análisis de los transformantes por PCR con los cebadores específicos VelBPF (externo a la construcción en 5') y Hyg-G (casete higromicina). La banda de amplificación indica el suceso de interrupción por recombinación homóloga. **(C)** Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; el ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con la enzima *NcoI*, separado en un gel de 0.7% de agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada. Los tamaños de las bandas de hibridación correspondientes al alelo silvestre y al alelo nulo están indicados.

20.8.1. Generación de mutantes portadores del alelo truncado *velB* C341T

Con el fin de completar la información sobre un posible efecto dominante del alelo truncado *velB* C341T, seleccionado en la línea evolucionada Y4, que codifica una proteína VelB truncada, se decidió introducir dicho alelo en la cepa wt. Se utilizaron los oligonucleótidos velbPF y velBTR para amplificar un fragmento de 5kb a partir de ADN genómico de un aislado monospórico de la línea Y4, confirmado previamente como portador de la mutación. Dicho fragmento se utilizó junto con el casete de resistencia higromicina para cotransformar protoplastos de la cepa silvestre. Los transformantes obtenidos se

analizaron mediante PCR con los oligonucleótidos *velBY4F* y *velBY4R* seguido por un tratamiento con la enzima de restricción *MseI* que detecta la presencia de la mutación mediante el corte de la secuencia (Figura 52.A). Dicho análisis confirmó la presencia del alelo *velB C341T* en algunos transformantes (denominados *velbC341T+velB*) mediante la presencia de dos bandas, una de 1,1 kb correspondiente a *wt* y otra de 0,9 kb correspondiente al alelo *velB C341T* (Figura 52.B).

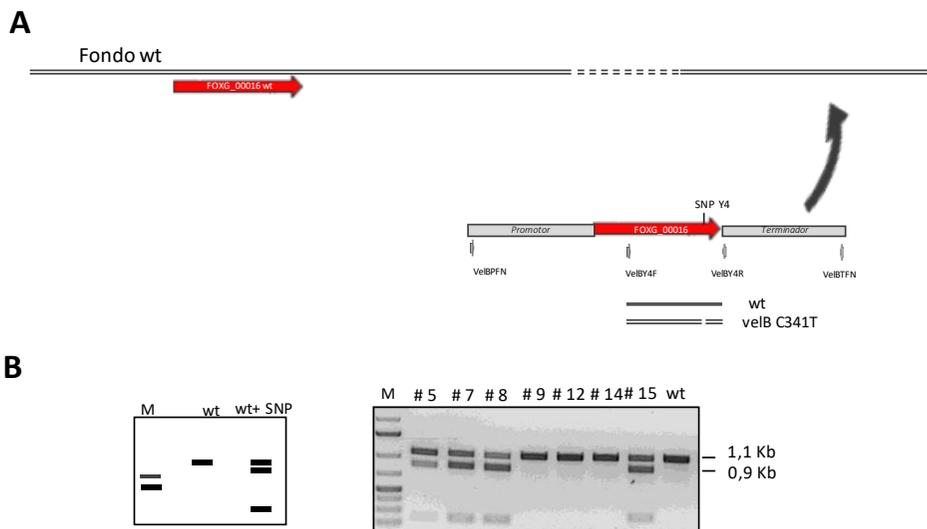


Figura 52. Introducción ectópica del alelo *velB C341T* en la cepa silvestre (A). Representación esquemática de la integración, al azar, del alelo mutado *velB C341T* obtenido a partir de la línea Y4 mediante co-transformación con el casete de resistencia a higromicina. **(B)** Análisis de los transformantes mediante RFLP: PCR con los cebadores específicos (*velBY4F* y *velbY4R*) seguida de una digestión con la enzima *MseI*

20.8.1. Ensayos fenotípicos en placa: velocidad de crecimiento y conidiación.

El descubrimiento de dos eventos aparentemente relacionados tras la evolución en placas de medio completo plantea la pregunta sobre las ventajas adaptativas que confieren estas dos mutaciones y que les han permitido desplazar gradualmente a la cepa silvestre a lo largo del experimento de

evolución. Para tratar de contestar a esta pregunta, se determinaron dos principales características fenotípicas relacionadas con la competitividad en placas, la velocidad de crecimiento y la capacidad de producir conidios, utilizando el mismo medio donde se había realizado la evolución experimental, es decir medio completo YPGA. Para el primer parámetro se midió el incremento del área de la colonia entre los días 2 y 3, mientras que para el segundo se realizó un recuento de conidios recogidos a partir de la colonia tras 7 días de crecimiento. En este análisis se utilizaron aislados monospóricos obtenidos tras el pasaje 10 de las línea Y2, que contenían la mutación *FOXG_21009::Hormin* sola (Y2-10.4) o en combinación con *FOXG_21009::Hormin + velB mut*, (Y2-10.3). Además, se añadió al estudio el mutante nulo $\Delta velB$ y se incluyó un transformante portador de los dos alelos, *velB* y *velB* truncado (*velBC341T*).

El ensayo de la velocidad de crecimiento de las distintas cepas demostró que la mutación *FOXG_21009::Hormin* confiere un incremento significativo en la velocidad de crecimiento respecto a la cepa wt (Figura 53.B). Dicho incremento se mantuvo también en la cepa portadora de la doble mutación *FOXG_21009::Hormin + velBmut*. Por el contrario, la velocidad de crecimiento del mutante $\Delta velB$ fue significativamente inferior comparado con la cepa wt mientras que la velocidad de la cepa *velBC341T*, portadora de los dos alelos fue igual que la de wt. Estos datos indican que la mutación que afecta positivamente la velocidad de crecimiento es la interrupción del gen *FOXG_21009* por el transposon *hormin*, mientras que las versiones truncadas de *velB* no tienen un efecto adicional sobre ese rasgo (Figura 53.B).

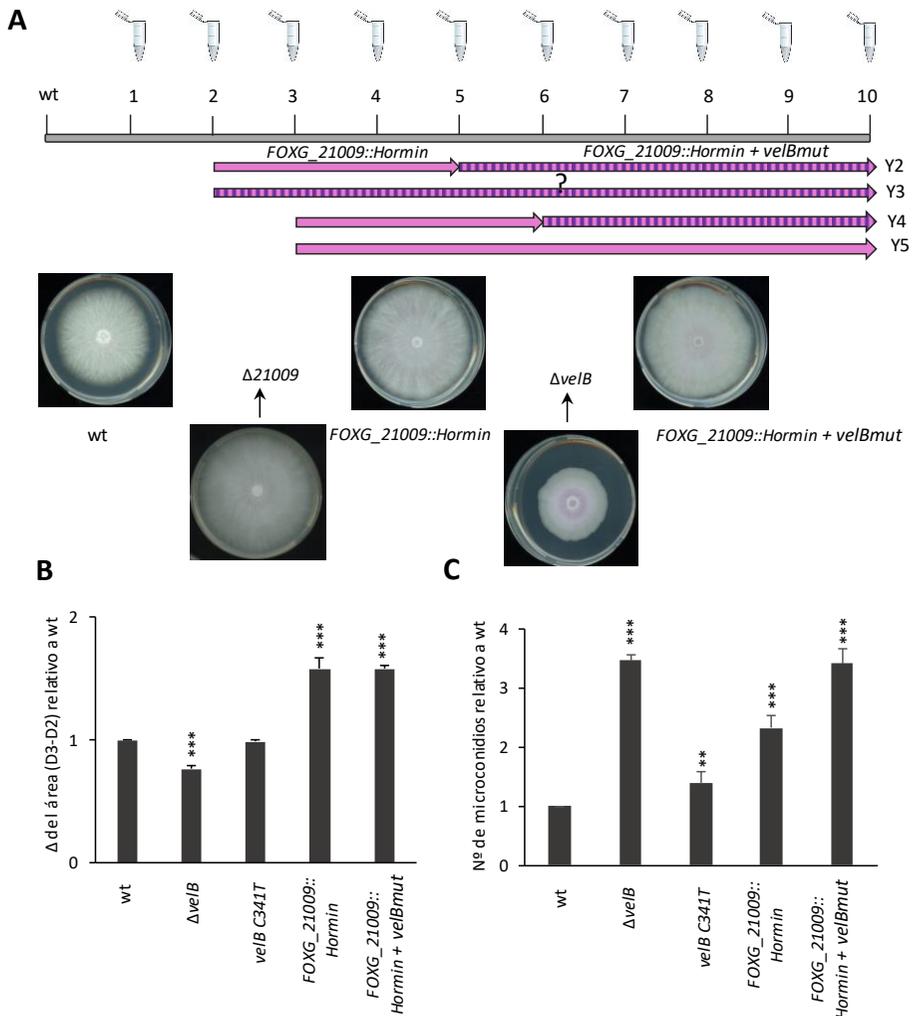


Figura 53 Las mutaciones en *FOXG_21009* y *velB* aumentan, respectivamente, la velocidad de crecimiento y la conidiación en las condiciones del experimento de evolución. **(A)** Dinámica temporal de aparición de las mutaciones en los genes *FOXG_21009* (inserción del transposon *hormin*) y *velB* (SNP) en las distintas líneas durante los pasajes del experimento de evolución. Las imágenes de placas muestran el fenotipo de crecimiento asociado a cada tipo de mutación. **(B,C)** Velocidad de crecimiento, expresado como la diferencia (Δ) del área de colonia entre los días 2 y 3 **(B)**, y capacidad de conidiación, expresado como el número de microconidios producidos relativo a wt **(C)**, de las cepas wt y portadoras de distintas mutaciones $\Delta velB$, *velBC341T*, *FOXG_21009::Hormin* y *FOXG_21009::Hormin+velBmut*. Las columnas representan el promedio de seis replicas biológicas independientes. * P=0.05, ** P=0.01, *** P=0.001, I según prueba de Dunnett. Las barras representan el error estándar de la media.

Por su parte, el efecto más pronunciado sobre la capacidad de conidiación en placa se observó en las mutaciones que afectan el gen *velB*. El mutante $\Delta velB$ tenía la mayor capacidad de conidiación de todas las cepas ensayadas, aunque con un valor muy similar al del aislado *FOXG_21009::Hormin + velBmut* (Figura 53.C). Por otro lado, el aislado *FOXG_21009::Hormin* también mostró un incremento significativo en la capacidad de conidiación frente a la cepa *wt*, aunque fue significativamente inferior a los mutantes *velB*. Por último, la cepa *velBC341T* también incremento su capacidad de conidiación frente a *wt*, aunque de manera menos pronunciada que las otras cepas (Figura 53.C).

20.8.1. Ensayos de co-inoculación de *wt* y cepas evolucionadas en plantas de tomate confirman la ventaja competitiva de la línea evolucionada.

Los resultados mostrados arriba sugieren la presencia, en las líneas evolucionadas, de mutaciones que les permiten alcanzar mayor frecuencia en un periodo de tiempo más corto. Con el fin de comprobar si estas mutaciones las hacen más competitivas en la condición donde fueron seleccionadas originalmente, se realizó un experimento de co-inoculación con una proporción 1:1 de microconidios de la cepa original *wt* y de un aislado monospórico obtenido a partir del último pasaje 10 de la línea P2, evolucionada en planta (Figura 54). El experimento consistió en reproducir un único paso de selección en las mismas condiciones utilizadas en la evolución experimental. En el análisis se determinó la proporción de biomasa de las dos cepas al inicio de la infección (control) y tras 11 días, tanto en la raíz como en la parte superior del tallo de las plantas infectadas. Para distinguir las dos cepas se utilizaron cebadores específicos diseñados para el estudio de la dinámica evolutiva que permitía calcular la proporción relativa de ADN de cada una de las dos cepas co-inoculadas.

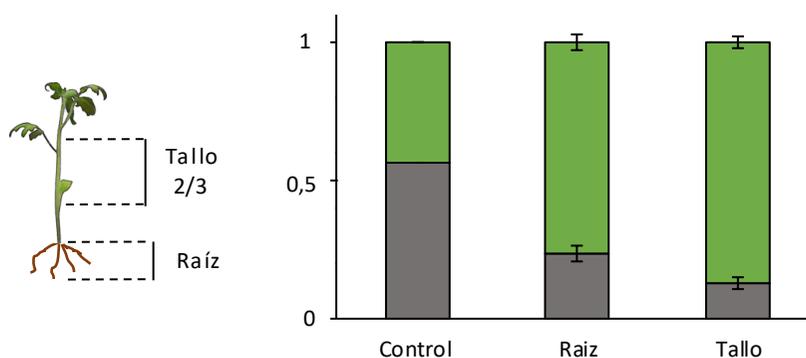


Figura 54. Los pasajes sucesivos a través de plantas de tomate aumentan la competitividad en la colonización. Las raíces de tomate se inocularon con una mezcla (2.5×10^6 cada una) de microconidios de la cepa silvestre (wt) y el aislado monospóric P2-10.1, obtenido a partir de la población P2 evolucionada en planta. El histograma muestra la carga fúngica relativa de las dos cepas presente en el inóculo inicial (control) y a los 11 días tras la co-inoculación en la raíz y en la parte superior del tallo, calculada mediante PCR con combinaciones de cebadores específicas de cada cepa. Las barras de error se calcularon a partir de tres replicas biológicas, cada una con tres plantas.

La carga fúngica medida tanto en la raíz como en el tallo 11 días tras la inoculación demostró, que la cepa evolucionada (P2-10.1) era claramente más eficiente en colonizar plantas de tomate que la cepa wt, ya que la proporción de la cepa wt bajo del 55 % al inicio (control) al 20 % en la raíz y al 10 % en el tallo.

20.8.2. Ensayos de co-inoculación de wt y cepas evolucionadas en placas de medio completo confirman la ventaja competitiva de las líneas evolucionadas.

Para investigar la posible mejora adaptativa producida por las mutaciones recurrentes en los genes *FOXG_21009* y *ve1B* seleccionadas en las líneas evolucionadas en medio completo, se llevó a cabo un ensayo de co-inoculación de distintas cepas en placas YPGA. Al igual que en el ensayo de competición en plantas, se co-inocularon esporas de la cepa wt y de un aislado monospóric obtenido a partir del pasaje 10, en la proporción de 1:1 en el centro de placas de medio completo YPGA. Transcurridos 7 días se recogieron los microconidios de

cada placa y se determinó la proporción de biomasa de las dos cepas, comparándola con la de inicio, utilizando cebadores específicos. Además, para completar la información se utilizaron distintos aislados monospóricos obtenidos del pasaje 10, caracterizados genéticamente. De esta manera se eligió un aislado de la línea Y2 (Y2-10.4) y otro de la línea Y4 (Y4-10.3), ambos portadores de la mutación *FOXG_21009::Hormin*, además de dos aislados de cada línea, portadores las dobles mutaciones *FOXG_21009::Hormin + velBmut* (Y2-10.1; Y2-10.3; Y4-10.4; Y4-10.8).

La figura 55 muestra las proporciones de microconidios encontradas al inicio de (Día 0) y al final del experimento (Día 7). En esta condición se observó una clara ventaja competitiva del aislado Y2-10.4, portador de la mutación *FOXG_21009::Hormin*, respecto a la cepa wt, ya que la proporción de microconidios detectada al final del experimento fue del 95%. Además, este resultado coincide con la observación que el fenotipo de colonia mezclada fue parecido al del aislado Y2-10.4 y no a la cepa wt. En los dos aislados portadores de la doble mutación *FOXG_21009::Hormin* y *velBmut*, la ventaja competitiva fue aun más clara, acabando con el desplazamiento total de la cepa wt tanto por el aislado Y2-10.1 como por Y2-10.3, lo que volvió a coincidir con el fenotipo de colonia observado.

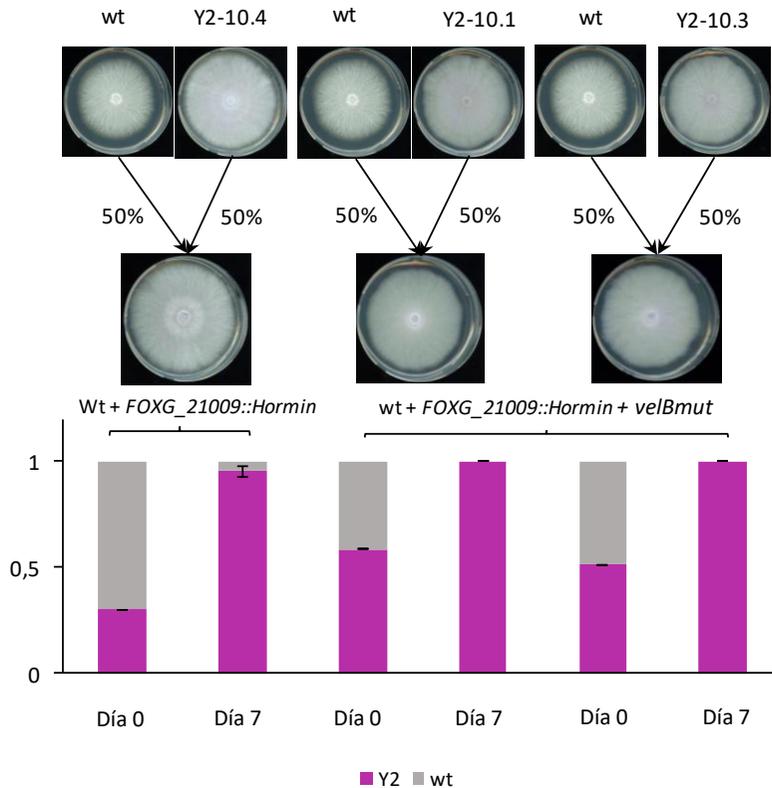


Figura 55. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y aislados evolucionados de la línea Y4 en placas de medio completo. Las cepas indicadas se co-inocularon en la proporción 1:1 en condiciones análogas las utilizadas en la evolución experimental (Día 0). Tras 7 días se recogieron los microconidios de la colonia (Día 7) y se calculó la proporción de DNA de las líneas *FOXG_21009::Hormin* (Y10-2.4) y *FOXG_21009::Hormin + velBmut* (Y10-2.1; Y10-2.3) frente al total por PCR con oligonucleótidos de la inserción del transposón hormin. Las barras de error se calcularon a partir de cuatro replicas biológicas.

Un segundo ensayo con aislados monospóricos de la línea Y4 produjo los mismos resultados que el experimento con la línea Y2. Nuevamente el aislado portador de la mutación *FOXG_21009::Hormin* desplazó casi completamente a la cepa silvestre, mientras que los dos aislados con las dos mutaciones *FOXG_21009::Hormin* y *velBmut* la desplazaron completamente.

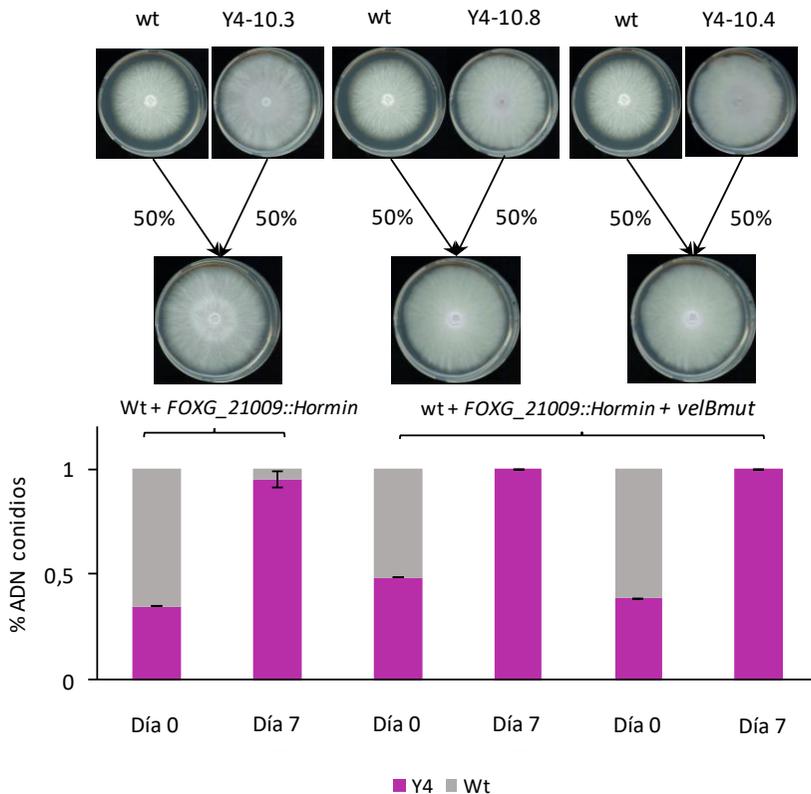


Figura 56. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y aislados evolucionados de la línea Y2 en placas de medio completo. Las cepas indicadas se co-inocularon en la proporción 1:1 en condiciones análogas a las utilizadas en la evolución experimental (Día 0). Tras 7 días se recogieron los microconidios de la colonia (Día 7) y se calculó la proporción de DNA de las líneas *FOXG_21009::Hormin* (Y10-4.3) y *FOXG_21009::Hormin + velBmut* (Y10-4.8; Y10-4.4) frente al total por PCR con oligonucleótidos específicos de la inserción del transposón *hormin*. Las barras de error se calcularon a partir de cuatro replicas biológicas.

Ya que ni en línea Y2 ni en la Y4 fue posible obtener un aislado monospórico que solo tuviera la mutación en el gen *velB*, debido a que estas surgieron en ambos casos cuando ya se había fijado en la población la mutación *FOXG_21009::Hormin*, se llevó a cabo el experimento de competición con el mutante $\Delta velB$, co-inoculado en la misma proporción con la cepa silvestre. Además, también se incluyó un mutante ($\Delta velBM$) que porta una delección parcial de la región codificante de *velB* (López- Berges, *et al*, 2010). Tal como se muestra en la figura X, el aspecto de la colonia mezclada mostró un fenotipo similar a

ΔvelB, a excepción de un sector que muestra fenotipo wt. Este resultado fue inesperado teniendo en cuenta que, cuando se cultivan ambas cepas por separado, el wt crece más rápido que las cepas *ΔvelB* o *ΔvelBM*. Por lo tanto, este resultado indica que *ΔvelB* y *ΔvelBM* son capaces de inhibir el crecimiento de la cepa wt desde el inicio del experimento. El análisis de PCR sobre el ADN extraído de los conidios confirmó este resultado, ya que se detectaron porcentajes de 70% y 85% de las cepas *ΔvelB* y *ΔvelBM*, respectivamente, a los 7 días tras la inoculación.

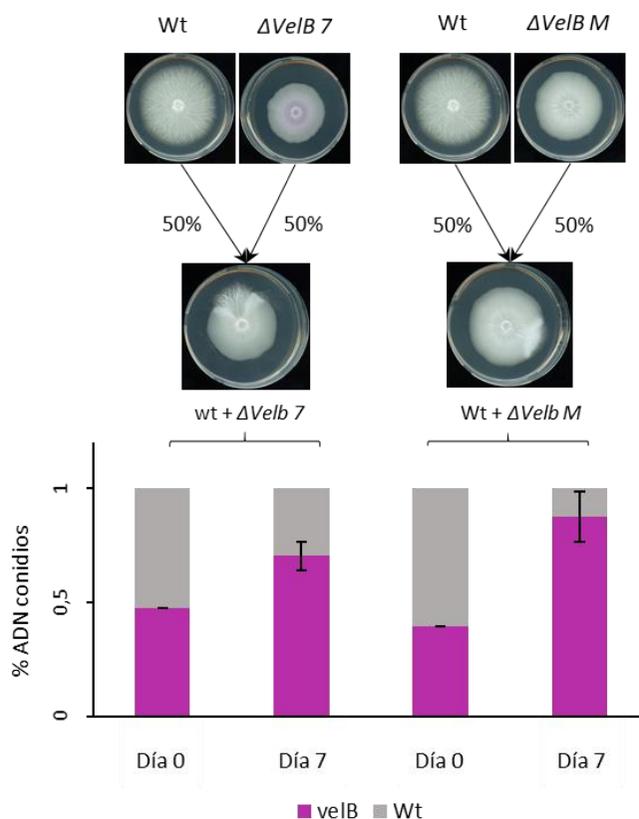


Figura 57. Ensayo de competición entre la cepa silvestre y mutantes *ΔvelB* en placas de medio completo. Las cepas indicadas se co-inocularon en la proporción 1:1 en condiciones análogas a las utilizadas en la evolución experimental (Día 0). Tras 7 días se recogieron los microconidios de la colonia (Día 7) y se calculó la proporción de DNA de *ΔvelB* frente al total por qPCR con oligonucleótidos del casete HYG (específico de *ΔvelB*)

y del gen actina (control), normalizada respecto a la proporción en el DNA de la cepa $\Delta veIB$ pura. Las barras de error se calcularon a partir de cuatro replicas biológicas.

Resultados: Capitulo 3

21. Introducción

De todo el análisis evolutivo anterior, destacan varios genes que hemos considerado diana por la repetición del evento en una misma condición evolutiva. Este es el caso de *FOXG_21009* y *FOXG_00016*, estudiados en detalle en el apartado anterior. *FOXG_00016* o *velB* pertenece a una familia génica cuyo miembro más estudiado es el gen *velvet* o *veA*, en el que además, curiosamente, también se ha detectado una mutación en la línea evolutiva M4. Con esta información, y dado que los aislados evolucionados con estas mutaciones ven disminuida su capacidad de infectar plantas de tomate (Ver apartado ...), en este capítulo estudiaremos un metabolito secundario relacionado con la patogénesis y esta familia génica. Dentro de los metabolitos secundarios producidos por *F. oxysporum*, la beauvericina (BEA) y el ácido fusárico (FA) han estudiado en detalle. Su relación con el complejo velvet está clara ya que se ha visto que los mutantes ΔveA , $\Delta velB$ y $\Delta laeA$ muestran una reducción muy significativa en la producción de ambas toxinas. (López -Berges et al 2010).

El FA, un derivado del ácido picolínico aislado originalmente de *Fusarium heterosporium* (Yabuta et al., 1937), fue la primera fitotoxina fúngica aislada de plantas infectadas (Gäumann, 1957). Además, el FA también ha mostrado toxicidad en animales (Yin et al., 2015; Porter et al., 1995; Bacon et al., 2006; Ruiz et al., 2015). Las bases moleculares de la toxicidad de este metabolito no están claras, los mecanismos sugeridos incluyen la modificación del potencial de membrana, la inhibición de la síntesis de ATP, un efecto quelante de iones metálicos o la fuga de electrolitos (D'Alton & Etherton, 1984; Marrè et al, 1993; Pavlovkin, 1998; Ruiz et al, 2015), así como una posible participación en la muerte celular programada (Jiao et al., 2013; Samadi y Shahsavan Behboodi, 2006).

Aunque el FA se encuentra entre los metabolitos secundarios identificados más antiguos producidos por el género *Fusarium*, se sabe muy poco de sus dianas

celulares y de su función en la patogénesis. Aquí, investigamos su papel dentro de la cepa Fol 4287 a través de la eliminación dirigida del gen *fub1*, que codifica un ortólogo de la policétido sintasa involucrada en la biosíntesis de FA en *F. verticillioides* y *F. fujikuroi*. Además, mostramos que la expresión de *fub1* está controlada positivamente por el regulador global del metabolismo secundario LaeA, componente del complejo velvet, junto con el regulador de pH alcalino PacC a través de la modulación de la accesibilidad de la cromatina en el locus *fub1*.

Hemos demostrado que la ausencia de Fub1 en *F. oxysporum* provoca una reducción en la mortalidad en plantas de tomate y ratones inmunocomprometidos. Respecto a fitotoxicidad del FA en las plantas, hemos observado una mejora en la tolerancia de la planta a la toxina mediante el suministro exógeno de cobre, hierro o zinc, lo que sugiere una posible función del FA como agente quelante de estos iones metálicos. En su conjunto, nuestros resultados han proporcionado nuevos datos sobre la regulación y el modo de acción del FA, así como sobre su función durante el proceso de infección de *F. oxysporum*.

Este trabajo se ha realizado en colaboración con Vahid Rahjoo

21.1. Efecto del pH y los nutrientes en la expresión de *fub1* y la producción de FA

En *F. fujikuroi*, la transcripción de *fub1* está regulada positivamente por PacC a pH 8, pero no a pH 4 (Niehaus et al., 2014). Inicialmente el pH del medio Czapek-Dox agar (CDA) es de $6,8 \pm 0,2$, mientras que el PDA tiene un pH inicial de aproximadamente $5,6 \pm 0,2$. Además, el pH en CDA, en el que NaNO_3 es la única fuente de nitrógeno, tiende a aumentar durante el crecimiento de las cepas. Para discriminar entre los efectos de la composición del medio y el pH en la biosíntesis

de FA, se germinaron conidios de la estirpe silvestre en PDB y se transfirieron las germínulas a los medios Czapek-Dox líquido (CDL) o PDB frescos tamponados a pH 5 o pH 7. Inesperadamente, en ambos medios, tanto la transcripción de *fub1* como la producción de FA fueron mucho más altas en condiciones ácidas moderadas, aunque, como se esperaba, en la condición con CDL se indujo en mayor cantidad (Figura. 58A y 58B).

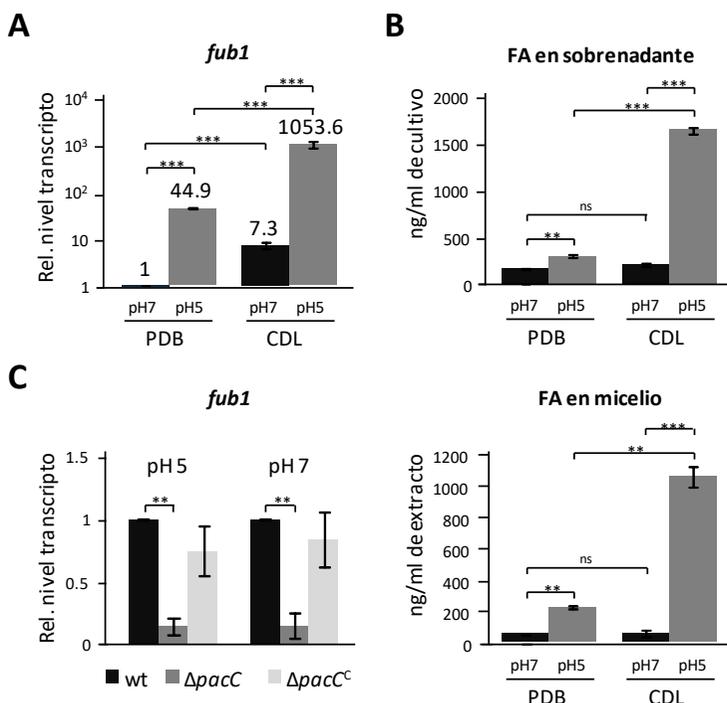


Figura 58. El pH y la composición del medio regulan los niveles de transcripción de *fub1* y la producción de FA. (A) RT-PCR cuantitativa en tiempo real realizada con la cepa silvestre (wt) germinada durante 16 h en PDB y luego transferida durante 3 h a PDB o CDL tamponado pH indicado. Los niveles de transcripción de *fub1* se expresan relativos a los obtenidos en PDB a pH 7. **(B)** Cuantificación de FA en los sobrenadantes de los cultivos (panel superior) y en el micelio (panel inferior) de wt crecida como en (A) realizada con un análisis LC-MS/MS cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem. **(C)** RT-PCR realizada en las cepas indicadas germinadas durante 16 h en medio MMG y luego transferidas durante 3 h a MMG fresco tamponado al pH indicado. Los niveles de transcripción de *fub1* se expresan relativos a los obtenidos en wt. Las barras representan errores estándar de dos experimentos biológicos independientes con tres repeticiones técnicas cada uno. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$; ns, no significativo.

Nuestros resultados indican que tanto el pH como los nutrientes son factores importantes en la regulación de la biosíntesis de FA, y que esta regulación puede ser diferente entre *F. oxysporum* y *F. fujikuroi*. Para confirmar este resultado el siguiente paso fue comprobar el papel de PacC en la regulación de *fub1* utilizando un mutante de pérdida de función de este gen (Caracuel, *et al* 2003). Los niveles de transcripción de *fub1*, en germínulas cultivadas en medio mínimo tamponado a pH 5 o pH 7 y suplementado con glutamina (MMG) como fuente de nitrógeno, fueron 10 veces más bajos en $\Delta pacC$ en relación con la estirpe silvestre (wt) para ambos valores de pH (Figura. 58C) lo que confirma que PacC funciona como un regulador positivo de *fub1* dentro de este rango de pH.

21.2. La estructura de la cromatina en el locus *fub1* está controlada por el regulador global del metabolismo secundario LaeA y el factor de respuesta a pH PacC

El crecimiento en placa del mutante $\Delta fub1$ es muy similar al de la estirpe silvestre tanto en PDA como en CDA; sin embargo, se observaron notables diferencias en presencia de higromicina B (Figura. 60A). Tanto el mutante $\Delta fub1$ y su complementado, $\Delta fub1^c$ crecían mucho peor que los transformantes ectópicos (Ect) en presencia del marcador seleccionable (Figura. 59A). Nuestra hipótesis fue que este fenotipo podría deberse a un efecto regulador de la cromatina en la transcripción del gen de resistencia a la higromicina *hph* insertado en el locus *fub1*. De acuerdo con esta hipótesis, encontramos que los niveles de transcripción de *hph* fueron entre 30 y 50 veces más altos en Ect que en $\Delta fub1$ y $\Delta fub1^c$ (Figura. 59B).

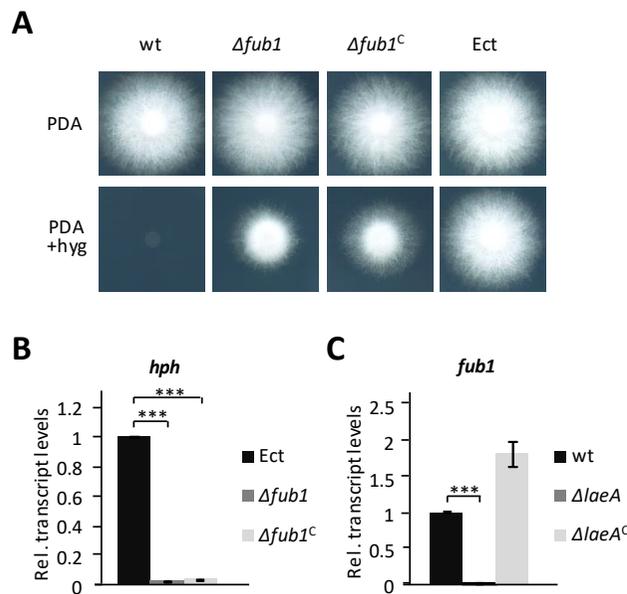


Figura 59. La transcripción de *fub1* está regulada por LaeA. (A) Colonias de las cepas indicadas crecidas en PDA con o sin 50 mg/ml de higromicina B durante 3 días a 28 °C. (B, C) RT-PCR cuantitativa en tiempo real en las cepas indicadas germinadas durante 16 h en PDB y luego transferidas a PDB fresco durante 1 h. Los niveles de transcripción de los genes *hph* (B) y *fub1* (C) se expresan relativos a los obtenidos con el transformante ectópico y la estirpe silvestre, respectivamente. wt, estirpe silvestre; Ect, transformante ectópico. Las barras representan errores estándar de dos experimentos biológicos independientes con tres repeticiones técnicas cada uno. *** P <0,0001.

Como LaeA es un regulador global de genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios en diferentes hongos (Bok y Keller, 2004; Butchko *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2010) y ya se conocía su implicación en la regulación de la producción de FA en *Fusarium* (López-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014), decidimos estudiar los niveles de expresión de *fub1* en el mutante $\Delta laeA$. Dichos niveles fueron entre 300 y 500 veces más altos en la cepa silvestre que en el mutante $\Delta laeA$ (Figura 59C). En base a estos resultados, decidimos examinar más detenidamente el papel de LaeA en la remodelación de la cromatina y la regulación transcripcional en el locus *fub1* de *F. oxysporum*. Para ello, se utilizó la PCR cuantitativa a tiempo real con oligonucleótidos específicos del promotor y la región codificante de *fub1* sobre

ADN genómico (ADNg) obtenido a partir de micelios tratados con una nucleasa microcócica (MNasa).

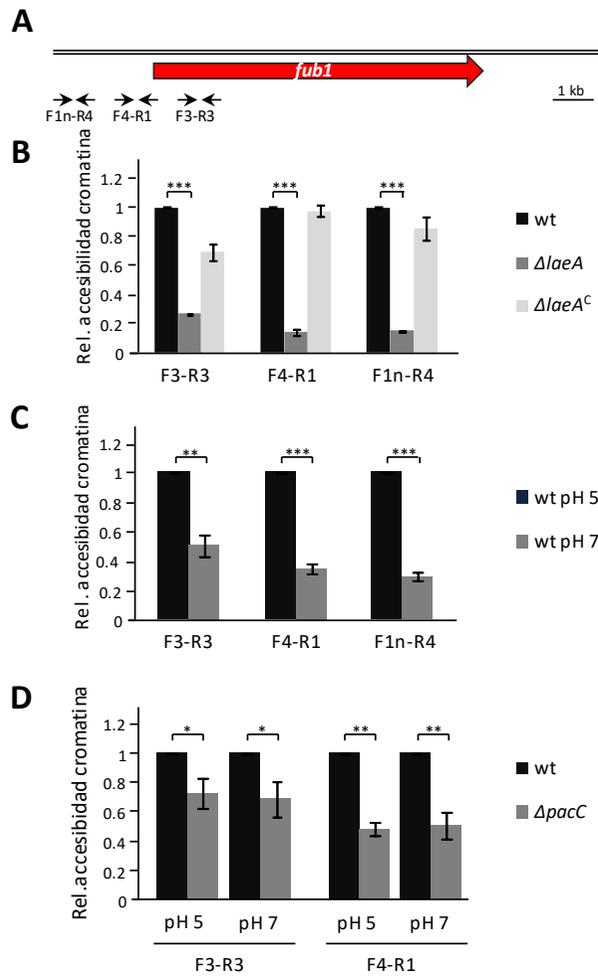


Figura 60. LaeA, pH y PacC regulan las modificaciones de la cromatina en el locus *fub1*. (A) Mapa físico de la región promotora del gen *fub1*. Se indican los oligonucleótidos utilizados para el análisis de la cromatina. (B-D) RT-PCR cuantitativa a tiempo real realizada con ADNg de las cepas indicadas crecidas como en las Figura. 60B y 60C. La accesibilidad relativa de la cromatina se calculó como la relación de los niveles de amplificación obtenidos sobre ADNg de micelios no tratados frente al ADNg de micelios tratados con MNasa, en relación a los obtenidos en la cepa silvestre (B), a la cepa silvestre a pH 5 (C) o la cepa silvestre a diferentes valores de pH (D). Las barras representan errores estándar de dos experimentos biológicos independientes con tres repeticiones técnicas cada uno. * P <0.05; ** P <0,001; *** P <0.0001

La accesibilidad relativa de la cromatina fue aproximadamente seis veces mayor en la cepa silvestre y $\Delta laeA^C$ que en $\Delta laeA$ (Figura 60B). Además, esta accesibilidad relativa fue significativamente menor a pH 7 en comparación con pH 5, y en $\Delta pacC$, a ambos valores de pH, en comparación con la estirpe silvestre (Figuras 60C y 60D), en consistencia con los niveles de transcripción de *fub1* anteriormente descritos (Figuras 58A y 58C). Concluimos que la accesibilidad de la cromatina en el locus *fub1*, y por tanto la expresión del gen, y en consecuencia la producción de FA y sus derivados, están regulados positivamente por *LaeA*, pH ácido moderado y *PacC*.

21.3. El FA no es necesario para el crecimiento de *F. oxysporum* en condiciones limitantes o tóxicas de cobre, hierro o zinc

La capacidad del FA para quelar iones metálicos, como el hierro o el cobre, es conocida desde hace mucho tiempo (Lakshminarayanan y Subramanian, 1955; Malini, 1966; Pan et al., 2010; Tamari y Kaji, 1952). Por lo tanto, nos preguntamos si la producción de FA era necesaria para el crecimiento de *F. oxysporum* en condiciones limitantes de distintos iones metálicos. El déficit de cobre, hierro y zinc se logró mediante la adición de los quelantes específicos ácido batocuproindisulfónico sal disódica (BCS), ácido batofenantrolinadisulfónico sal disódica (BPS) y N,N,N',N'-Tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina (TPEN), respectivamente (Figura 62A).

El crecimiento de las distintas cepas no se vio alterado en condiciones limitantes de cobre (Figura 61A). Por el contrario, en ausencia de hierro o zinc se observaron graves defectos. En cualquier caso, la inactivación de *Fub1* no produjo ningún efecto adicional sobre el crecimiento en las diferentes condiciones analizadas. A continuación, nos preguntamos si *Fub1* era necesario para la adaptación a concentraciones tóxicas de cobre, hierro o zinc. Cuando las distintas cepas se cultivaron en MMG con hasta 5 mM de los diferentes iones metálicos,

no se encontraron diferencias significativas (Figura 61B.). Estos resultados demuestran que el FA no es esencial para el crecimiento bajo concentraciones limitantes o tóxicas de cobre, hierro o zinc; Sin embargo, notamos que los niveles de transcripción de *fub1* se redujeron significativamente en presencia de estos tres iones metálicos (Figura 61C).

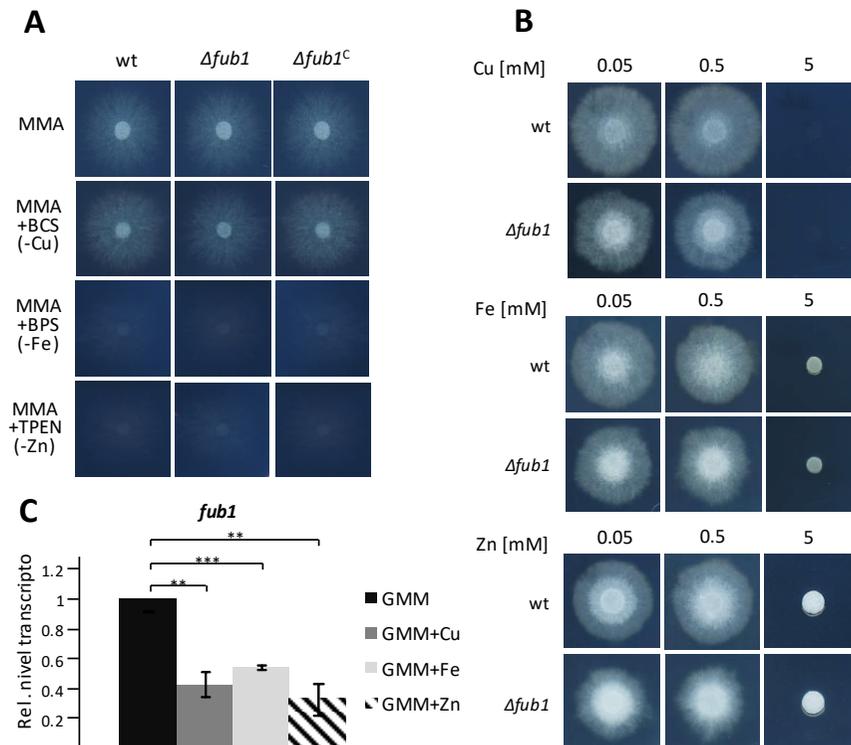


Figura 61. La expresión de *fub1* es reprimida por cobre, hierro y zinc. (A) Crecimiento de las cepas indicadas en MM con o sin los quelantes de metales indicados. Las placas se cultivaron durante 3 días a 28 °C. **(B)** Crecimiento de las cepas indicadas en medio MMG suplementado con las concentraciones indicadas de Cu, Fe o Zn. Las placas se cultivaron durante 3 días a 28 °C. **(C)** RT-PCR cuantitativa a tiempo real realizada en la cepa silvestre germinada durante 16 h en MGM sin Cu, Fe o Zn y luego suplementada o no con 50 μM CuSO₄, FeSO₄ o ZnSO₄ durante 2 h. Los niveles de expresión de *fub1* se expresan relativos a los obtenidos en wt; BCS, ácido batocuproindisulfónico sal disódica; BPS, ácido batofenantrolinadisulfónico sal disódica; TPEN, N,N,N',N'-Tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina. Las barras representan errores estándar de dos experimentos biológicos independientes con tres replicas técnicas cada uno. ** P <0,001; *** P <0,0001.

21.4. La toxicidad del FA en las plantas de tomate se revierte mediante la aplicación exógena de cobre, hierro y zinc

La producción y las propiedades fitotóxicas del FA han sido estudiadas durante los últimos 75 años (Bacon et al., 1996; Dong et al., 2014; Gäumann, 1957, 1958; Yabuta et al., 1937), lo que ha llevado a los investigadores a sugerir distintos mecanismos de acción de esta fitotoxina, muchos de ellos relacionados con modificaciones en la membrana celular de las plantas (D'Alton y Etherton, 1984). Para analizar la toxicidad del FA, se sumergieron las raíces de las plantas de tomate, con 3 semanas de edad, en agua estéril con o sin FA. Las plantas mantenidas en presencia de 0,5-1 mM de FA mostraron una despigmentación progresiva del tallo, muy probablemente como resultado de la degradación de la antocianina, seguida por una pérdida general de turgencia y, finalmente, el marchitamiento de toda la planta (Figura 62A).

Seguidamente, analizamos el efecto de la aportación externa de cobre, hierro o zinc, tanto a la solución de FA como mediante pulverización foliar, que permite la absorción de los iones a través de los estomas y su distribución sistémica por toda la planta (Eddings y Brown, 1967; Neumann y Prinz, 1975), y se observó que las plantas tenían una mayor resistencia a la presencia de FA, es decir, no perdieron turgencia ni mostraron síntomas de marchitez o pérdida de pigmentación del tallo (Figuras 62B-D).

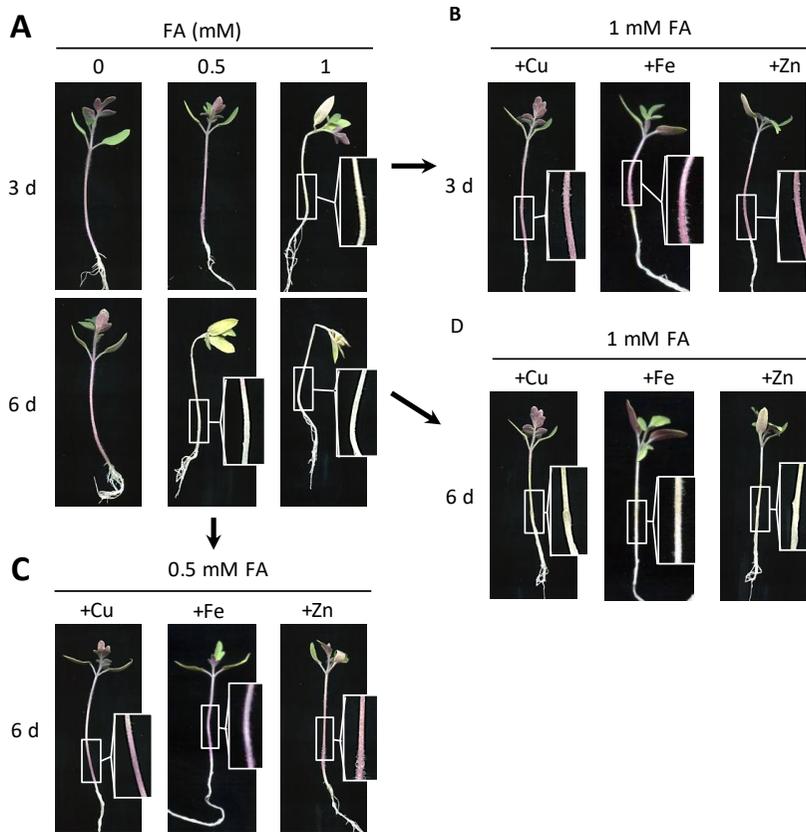


Figura 62. El efecto fitotóxico del FA en las plantas de tomate disminuye mediante la adición de cobre, hierro o zinc. (A) Las raíces de plántulas de tomate de 3 semanas de edad se sumergieron en agua estéril con las concentraciones indicadas de FA durante 3 y 6 días. (B-D) Las hojas de las plántulas se rociaron con soluciones de 0,025% CuSO_4 , FeSO_4 o ZnSO_4 antes de sumergir las raíces en la solución de FA. Las áreas amplificadas se muestran a doble aumento.

Además, el quelante de zinc permeable a la membrana TPEN produjo un efecto fitotóxico similar al producido por el FA (Figura 63), pero no a los quelantes impermeables a la membrana BPS o BCS. En conjunto, estos resultados sugieren que la fitotoxicidad del FA está mediada por el secuestro de iones metálicos dentro de la planta.



Figura 63. El quelante de zinc permeable a la membrana TPEN causa síntomas de fitotoxicidad similares al FA en las plantas de tomate. Las hojas de las plantas de tomate se trataron previamente o no con una solución 0,025 % $ZnSO_4$ y las raíces se sumergieron en agua estéril que contenía 4 μM TPEN durante 3 y 6 días. Las áreas amplificadas muestran a doble aumento.

Resultados: Capitulo 4

22. Introducción

Los resultados presentados en el capítulo 2 muestran la dinámica de los cambios detectados en las distintas poblaciones evolucionadas. Esto nos ha permitido descubrir, en cuál de los 10 pasajes realizados durante el experimento de evolución han surgido los distintos eventos estudiados. También reveló como de rápido estos cambios se fijaron en la población, en los casos donde lo hicieron, o incluso permitió observar, en algunos eventos, dinámicas con subidas y bajadas de la frecuencia en la población de manera errática y sin aparente explicación. El resultado de la secuenciación del último pasaje reveló un porcentaje (frecuencia) de la población distinto según cada mutación. Esto genera poblaciones heterogéneas de individuos, portadores de distintas mutaciones, lo cual complica enormemente el estudio encaminado a cuantificar los efectos fenotípicos de unas respecto a otras.

Para poder entender con más claridad los efectos fenotípicos derivados de algunas mutaciones concretas, se realizó un estudio con aislados monospóricos obtenidos a partir del último pasaje de cada una de las líneas y condiciones experimentales. Tras un análisis detallado de los resultados de la caracterización genotípica, se seleccionaron aislados monospóricos y, por lo tanto, individuos genéticamente homogéneos representativos de cada línea evolucionada, con mutaciones diferenciales que permitan estudiar el papel de esas mutaciones en los cambios fenotípicos detectados. De esta manera se pretende responder a preguntas tan interesantes como 1) si hay fenotipos seleccionados preferentemente en determinadas condiciones experimentales o 2) si existen determinadas mutaciones asociadas a fenotipos concretos.

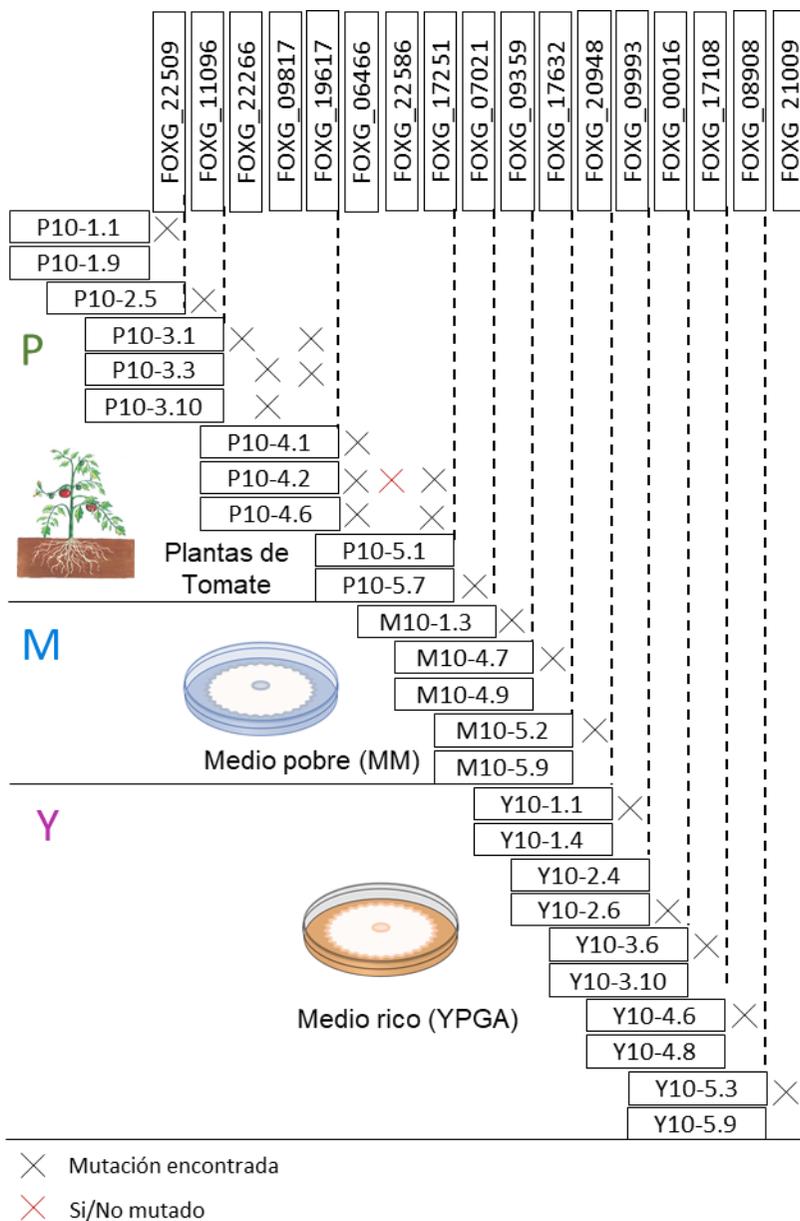
22.1. Obtención de aislados monospóricos a partir de las poblaciones del pasaje 10 de la evolución experimental y su genotipado.

Para poder estudiar a individuos concretos representantes de cada población se realizó un aislamiento monospórico a partir de las muestras guardadas a -80°C . El medio utilizado fue PDA para las poblaciones obtenidas de plantas de tomate y MM e YPGA para las poblaciones obtenidas en estos medios. Se aislaron 10 colonias de cada población, que fueron purificadas dos veces más en las mismas condiciones, para asegurar la pureza genética del aislado. Los microconidios de los aislados monospóricos fueron almacenados a -80°C para su posterior uso en experimentos fenotípicos. El número total de aislados obtenidos fue de 150, 10 por cada una de las cinco líneas evolucionadas en las tres condiciones.

Sobre los aislados se realizó un análisis genético para confirmar la presencia/ausencia de los eventos. Como ya se ha mencionado en el capítulo 2 fue imposible realizar un análisis completo de todas las mutaciones encontradas por secuenciación, por lo que el genotipado se considera parcial. Aun así, este abordaje nos ha permitido desarrollar perfiles individuales de mutaciones clave que han servido como base para la selección de los aislados utilizados para un exhaustivo análisis fenotípico.

Los perfiles seleccionados se detallan en la tabla 23. donde puede verse, dentro de una misma línea, individuos portadores o no de mutaciones en determinados genes. Por razones de claridad la tabla solo muestra las mutaciones diferenciales entre individuos de la misma línea, ya que el resto de los datos puede consultarse en detalle en el anexo II. De los 150 aislados monospóricos obtenidos se seleccionaron 26 para el análisis fenotípico detallado: 11 de plantas, 5 de medio mínimo y 10 de medio completo.

Tabla 23. Aislados monospóricos seleccionados a partir de las distintas líneas y condiciones de evolución experimental. Arriba se indican los números identificativos de los genes afectados por las mutaciones diferenciales caracterizadas.



22.2. Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados

Para facilitar la comprensión de los datos arrojados por los ensayos fenotípicos, los resultados se muestran en una tabla resumen individual para cada condición de evolución experimental (planta, MM e YPGA) con cada aislado monospóricamente seleccionado.

Primero se analizó el fenotipo de colonia en tres medios distintos YPGA, MM y PDA. Como puede verse en la figura 64, los aislados exhibieron distintas características morfológicas en el color o modos de crecimiento de la colonia, tanto entre líneas según condición experimental como también entre aislados de la misma línea. Se observó un fenotipo muy homogéneo en los 11 aislados de las 5 líneas de plantas, a pesar de la variabilidad de mutaciones detectadas. Esto tiene sentido, ya que la selección se ha hecho en plantas y no en medio sólido. Por el contrario, los aislados de las otras dos condiciones experimentales mostraron una gran variabilidad fenotípica en los tres tipos de medios. Entre los fenotipos más llamativos se observa un color morado intenso en algunas colonias crecidas en PDA. La distribución del color, diferencia de igual modo a los fenotipos entre colonias, con círculos concéntricos más intensos que en algunos casos se alternan o cambian el micelio aéreo a un color blanco. También se confirma lo observado en la evolución experimental, donde ya se notó una clara diferencia entre la línea Y1 y las otras cuatro líneas evolucionadas en medio completo. Como puede observarse, el fenotipo de colonia de los dos aislados de Y1 es muy parecido, pero difiere notablemente del aspecto y color de los aislados Y2-Y5. Sin embargo, en algunos casos también se observan diferencias más o menos claras entre distintos aislados de la misma línea que se pueden atribuir a mutaciones determinadas. Un ejemplo es lo observado en la línea Y2, donde los aislados Y2-10.4 e Y2-10.6 muestran fenotipos claramente distintos tanto en medio mínimo como en PDA. La única diferencia genética anotada es una mutación en el gen FOXG_00016 (*velB*) en el aislado Y2-10.6 que se describe en detalle en el capítulo

2. Esta mutacion produce un crecimiento plano del micelio que contrasta con el fenotipo de micelio aéreo abundante del aislado Y2-10.4 en el medio PDA. También se observaron fenotipos muy similares entre aislados obtenidos de condiciones experimentales distintas, por ejemplo, en los aislados Y5-10.3 (YPGA) y M4-10.9 (MM), cuyos fenotipos son casi idénticos en los tres medios utilizados.

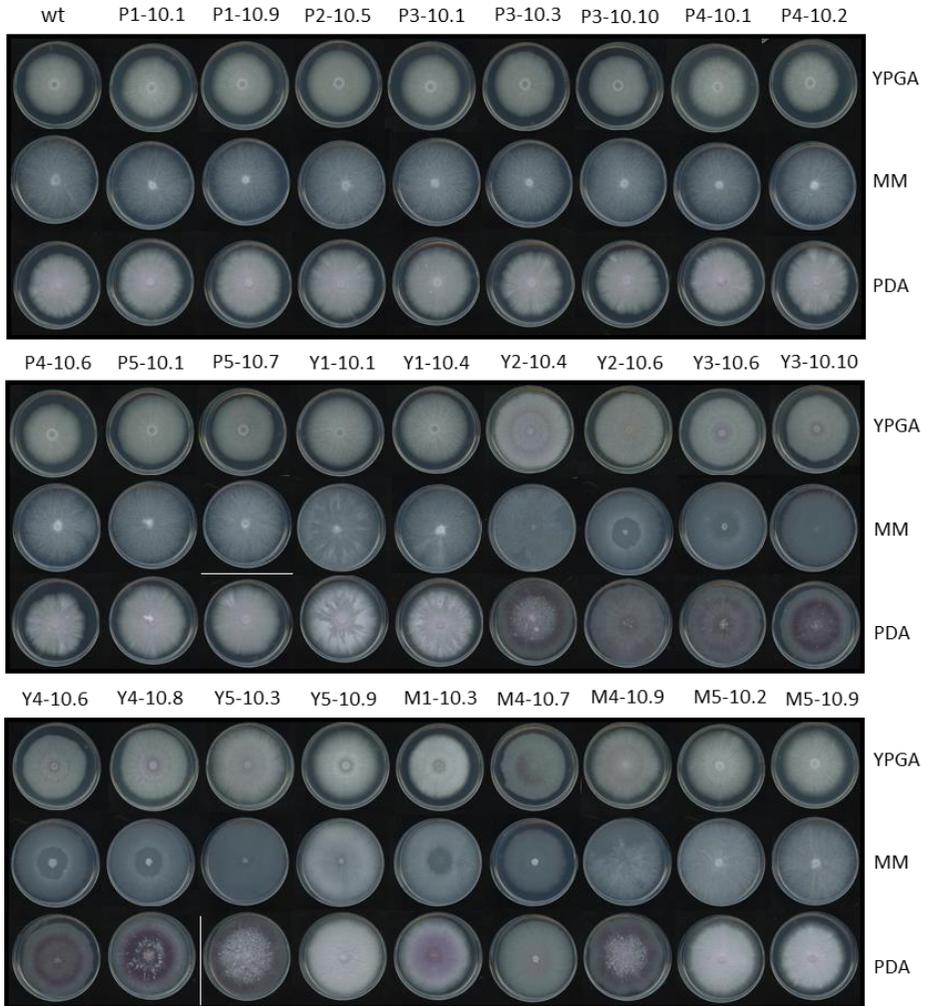


Figura 64 Caracterización fenotípica de los aislados monospóricos en placas con distintos medios de cultivo (YPGA, MM y PDA). Los aislados monospóricos son representativos de las líneas obtenidas en las tres condiciones de evolución (P, Y, M). Se observa una gran variabilidad tanto en el crecimiento como en el color de la colonia.

A continuación, se realizaron experimentos fenotípicos de acuerdo con varios criterios de interés, clasificados en tres bloques distintos. El primer bloque está relacionado con la respuesta a cuatro tipos distintos de estrés: pared (50 µg/mL Calcoflúor White, CFW), oxidativo (10 µg/mL menadiona, Med); salinidad (1,5M NaCl); y temperatura alta (34°C). En todos los casos se evaluó el crecimiento diferencial respecto a la cepa wt, mostrando como positivo una mayor resistencia y como negativo una mayor sensibilidad al estrés.

En el segundo bloque de ensayos contenía una serie de fenotipos variados: capacidad de conidiación en líquido y velocidad de crecimiento en placa, ambos en medio mínimo; y la capacidad de penetrar membranas de celofán en medio mínimo tamponado a pH 5 o 7. Para los ensayos de conidiación y velocidad de crecimiento, los resultados se muestran en las tablas resumen nuevamente como positivos o negativos en comparación con la cepa wt, en tres rangos distintos de intensidad. En el caso de la penetración del celofán, un símbolo positivo denota que el hongo traspasó el celofán y el negativo que no lo hizo.

Finalmente, en el último bloque de ensayos se determinó la capacidad de causar mortalidad en plantas de tomate o en el modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

22.2.1. Fenotipos de los aislados evolucionados en plantas

En la tabla 24 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los distintos análisis fenotípicos realizados con los aislados obtenidos a partir de las poblaciones evolucionadas en plantas. Los resultados experimentales se muestran en las figuras a continuación de la tabla.

Tabla 24 Resumen de los resultados de los ensayos fenotípicos con 11 aislados monospóricos obtenidos a partir de distintas líneas evolucionadas en plantas de tomate.

	Estreses				Conidiación		Celofán		Vel. creci	Infección	
	CFW	Med	NaCl	34°C	MM	pH 5	pH 7	MM	Planta	Larva	
P1-10.1	--				--	+	+			-	
P1-10.9	--				--	+	+				
P2-10.5	-					+	+			--	
P3-10.1	--					+	+				
P3-10.3	-		-		--	-	+				
P3-10.10	-	-	-		-	+	+				
P4-10.1						+	+			-	
P4-10.2					--	+	+			--	
P4-10.6					--	-	+			---	
P5-10.1	-					-	+			---	
P5-10.7	-	--				-	+			-	



Entre los cuatro tipos de estreses analizados el que mostro producir un mayor efecto diferencial en los aislados analizados fue el estrés de pared por CFW, un compuesto que se une a la quitina. Como puede observarse en la Figura 65, la mayoría de los aislados evolucionados en planta crecieron de manera más restringida en presencia de CFW, aunque este fenotipo no fue tan claro en los tres aislados de la línea P4 (P4-10.1, P4-10.2 y P4-10.6), más próximos al crecimiento del wt. En el caso del estrés oxidativo no se observaron grandes diferencias entre los distintos aislados y la cepa silvestre, a excepción de P5-10.7 y P3-10.10 que mostraron una mayor inhibición. En el estrés salino se observó un efecto similar al anterior con escasas diferencias respecto a wt, excepto en dos aislados de la línea P3, P3-10.3 y, nuevamente, P3-10.10. Finalmente, en el estrés de temperatura alta no se detectaron diferencias en ninguno de los aislados analizados.

En la capacidad de conidiación sumergida, evaluada a los dos días tras la inoculación, se detectaron diferencias significativas según el test de Dunnet. Esta prueba estadística se realiza a través de ANOVA, donde se compara la media de los datos obtenidos en cada aislado de manera independiente a los obtenidos en la cepa wt. Los resultados mostraron diferencias significativas para los aislados P1-10.1; P1-10.9; P3-10.3; P4-10.2, P4-10.6 y P3-10.10 (Figura 66.A). Por lo contrario, no hubo diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre los distintos aislados de plantas y la cepa wt (Figura 66.B).

El último ensayo de este bloque determinó posible papel de las distintas mutaciones en la capacidad de traspasar una membrana de celofán. La cepa wt traspasa el celofán a pH 7 pero no a pH 5 (Masachis et al. 2016). Curiosamente, de todas los aislados evolucionados en planta solo cuatro se comportaron de manera análoga a la cepa silvestre, mientras que los restantes P1-10.1; P1-10.9; P2-10.5; P3-10.1; P3-10.10; P4-10.1; P4-10.2 fueron capaces de penetrar también a pH 5 (Figura 67).

Por limitación de espacio, la infección de plantas solo se ha podido ensayar en cinco de los aislados, P2-10.5; P3-10.1; P3-10.10; P4-10.1 y P5-10.7, y ninguno de ellos mostró diferencias significativas en el desarrollo de la enfermedad, con niveles de mortalidad similares a la cepa wt (Figura 68). En el ensayo de infección en larvas de *Galleria* se utilizaron todos los aislados. Aquí cabe destacar que la mayoría de los aislados ensayados causaron una mortalidad significativamente reducida, concretamente P1-10.1, P2-10.5, P4-10.1, P4-10.2, P4-10.6, P5-10.1 y P5-10.7 (Figura 69).

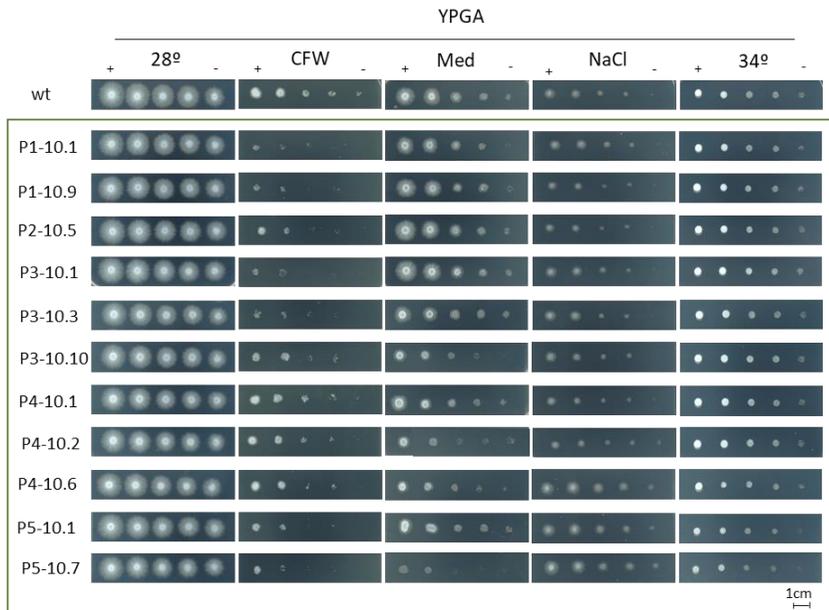


Figura 65 Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta. Crecimiento de los aislados indicados en placas de medio YPGA en condiciones óptimas (28°C), de estrés de pared (50 µg/mL Calcoflúor White), oxidativo (10 µg/mL Menadiona), salino (1,5M NaCl) y de alta temperatura (34°C). Las placas se incubaron 2 días, excepto YPGA a 34 °C que se incubó 3 días. La barra de tamaño indica 1 cm.

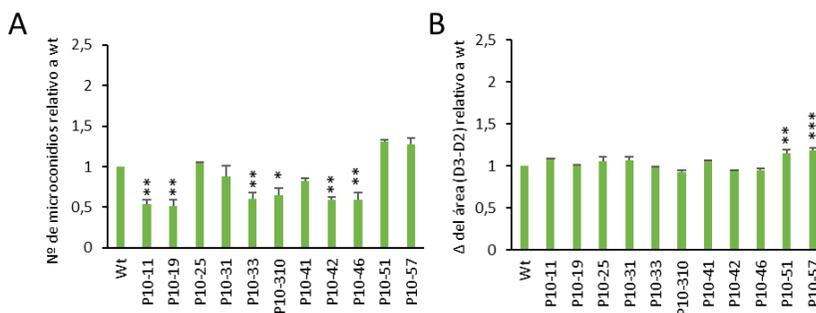


Figura 66. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta. (A) Número de microconidios producidos por los aislados indicados, en cultivo sumergido en medio mínimo líquido tras 2 días de incubación a 28°C y 170 rpm. Se inocularon 5·10⁶ microconidios/mL. (B) Velocidad de crecimiento expresado como incremento (Δ) del área de la colonia entre los días 2 y 3, relativo a wt. Se inocularon 10⁶ microconidios en el centro de una placa Petri con medio MM. Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. * P=0.05, ** P=0.01, *** P=0.001 según la prueba de Dunnett. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

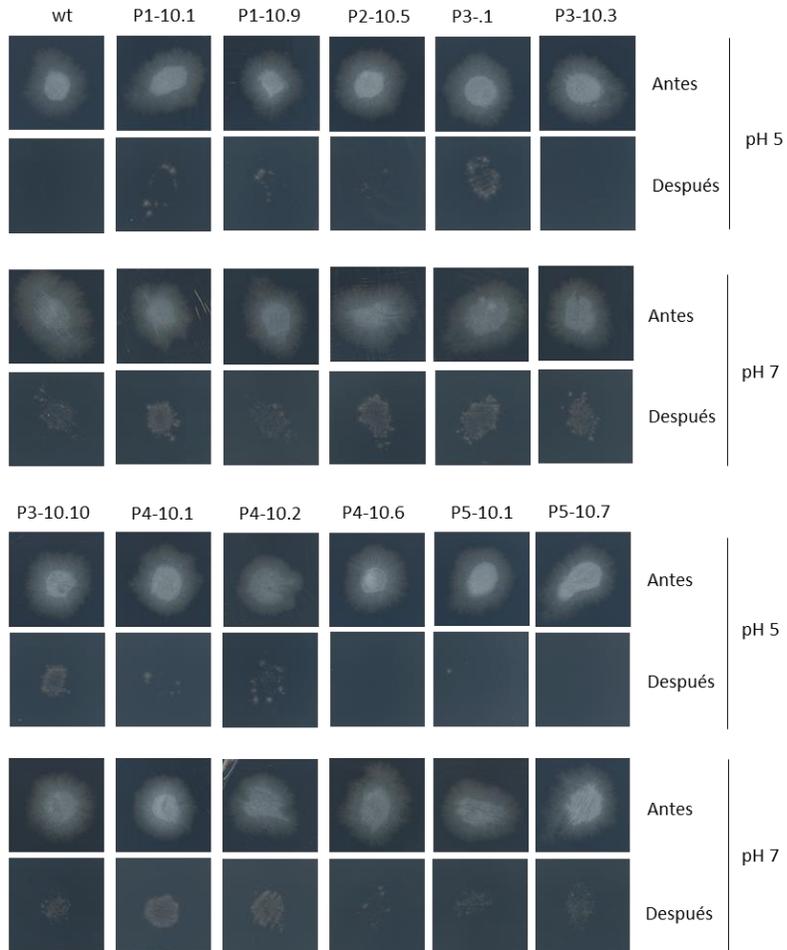


Figura 67. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta muestran crecimiento invasivo a pH 5. Se inocularon 5×10^4 esporas de las cepas indicadas en el centro de placas de medio mínimo cubiertas con una membrana de celofán y tamponadas a pH 5 o 7 con 100 mM MES y se incubaron 3 días a 28 °C (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y se incubaron un día más para determinar la presencia del hongo en el medio (después).

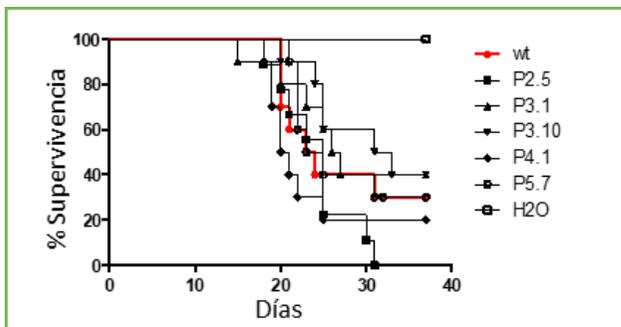


Figura 68. Ensayo de infección en plantas de tomate (cultivar Mónica). Grupos de 10 plantas se inocularon por inmersión en una suspensión de $2 \cdot 10^6$ microconidios/ml de los aislados monospóricos indicados, obtenidos de las poblaciones evolucionadas en plantas. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 35 días tras la inoculación. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$, según el test Log-Rank (Mantel-Cox).

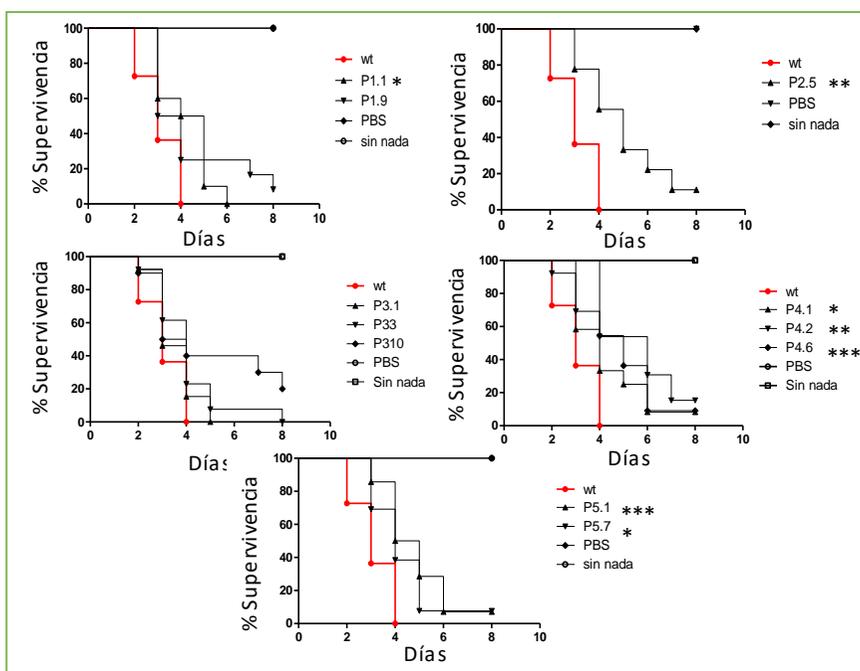


Figura 69. Ensayo de infección en larvas del gusano de la miel (*Galleria mellonella*). Grupos de 15 larvas se inocularon con $1.6 \cdot 10^4$ microconidios totales de los aislados monospóricos indicados, obtenidos de las poblaciones evolucionadas en plantas, mediante un microinyector. Como controles se utilizaron la cepa silvestre (wt) y larvas inoculadas con la solución salina (PBS). Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 7-9 días. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$, según el test Log-Rank (Mantel-Cox).

22.2.1. Fenotipos de los aislados evolucionados en medio mínimo

En la tabla 25 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los distintos análisis fenotípicos realizados con los aislados obtenidos a partir de las poblaciones evolucionadas en medio mínimo. Los resultados experimentales se muestran en las figuras a continuación de la tabla.

Tabla 25. Resumen de los resultados fenotípicos de los distintos aislados analizados obtenidos a partir del último pasaje de la evolución experimental en medio mínimo.

	Estrés				Conidiación	Celofán		Vel. creci	Infección	
	CFW	Med	NaCl	34°C	MM	pH 5	pH 7	MM	Planta	Larva
M1-10.3					+++	-	-	++		
M4-10.7	---	-	--			-	-	+++	--	
M4-10.9	-		---		+++	-	-	++	-	
M5-10.2	-					-	+	+++		-
M5-10.9	-					-	+	+++		---

-	--	---	Retroceso respecto a wt
+	++	+++	Mejoría respecto a wt
■	Sin resultado		
□	Igual wt		

Cómo puede observarse para el primero de los cuatro análisis de estrés, solo el aislado M4-10.7 mostró estar gravemente afectado en el crecimiento en presencia del compuesto CFW, mientras que el resto de aislados solo parecieron estar condicionados en la concentración más baja de microconidios (Figura 70). En el caso del estrés oxidativo no se observaron grandes diferencias entre los distintos aislados y la cepa silvestre, a excepción de M4-10.7 (Figura 79) que mostraron una mayor inhibición. En el estrés salino se observó un efecto similar al anterior con algunas diferencias respecto a wt, en dos aislados de la línea M4 M4-10.7 y M4-10.9 (Figura 70). Finalmente, en el estrés de temperatura alta no se detectaron diferencias en ninguno de los aislados analizados (Figura 70).

En la capacidad de conidiación sumergida, evaluada a los dos días tras la inoculación, se detectaron diferencias significativas según el test de Dunnet. Esta prueba estadística se realiza a través de ANOVA, donde se compara la media de los datos obtenidos en cada aislado de manera independiente a los obtenidos en la cepa wt. Los resultados mostraron diferencias significativas para los aislados M1-10.3 y M4-10.9 (Figura 71.A). Por lo contrario, no hubo diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre los distintos aislados de plantas y la cepa wt (Figura 71.B).

El último ensayo de este bloque determinó posible papel de las distintas mutaciones en la capacidad de traspasar una membrana de celofán. La cepa wt traspasa el celofán a pH 7 pero no a pH 5. De todas los aislados evolucionados en planta solo los aislados de la línea M5, M5-10.2; M5-10.9 se comportaron de manera análoga a la cepa silvestre, mientras que los restantes M1-10.3 M4-10.7 y M4-10.9 no pudieron traspasar el celofán en ningún de los dos pHs (Figura 72).

En el ensayo de plantas los dos aislados de M4 mostraron una reducción significativa en su capacidad para causar enfermedad. El caso más extremo fue M4-10.7 que fue totalmente asintomático en las diez plantas del ensayo mientras que M4-10.9 mostro una mortalidad significativamente menor que wt (Figura 73)

En el ensayo de infección en larvas de *Galleria* se utilizaron todos los aislados. Aquí solo los aislados M5-10.2 y M5-10.9 redujeron significativamente la mortalidad (Figura 74).

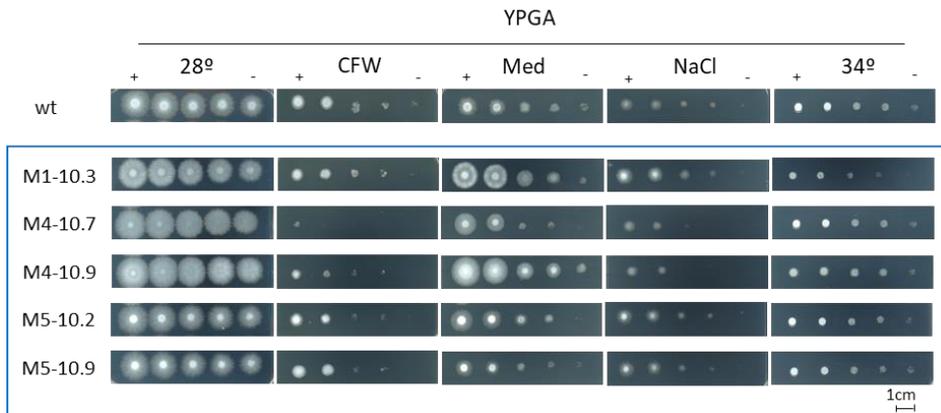


Figura 70. Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio mínimo. Crecimiento de los aislados indicados en placas de medio YPGA en condiciones óptimas (28°C), de estrés de pared (50 µg/mL Calcoflúor White), oxidativo (10 µg/mL Menadiona), salino (1,5M NaCl) y de alta temperatura (34°C). Las placas se incubaron 2 días, excepto YPGA a 34 °C que se incubó 3 días. La barra de tamaño indica 1 cm.

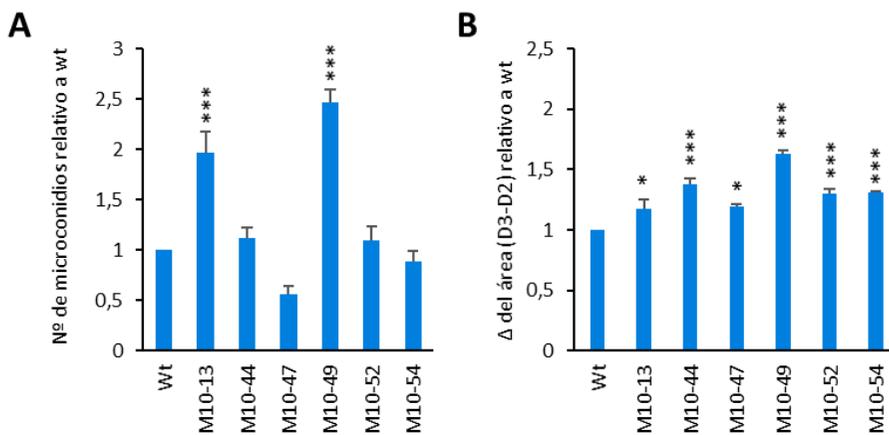


Figura 71. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio mínimo. (A) Número de microconidios producidos por los aislados indicados, en cultivo sumergido en medio mínimo líquido tras 2 días de incubación a 28°C y 170 rpm. Se inocularon 5·10⁶ microconidios/mL. (B) Velocidad de crecimiento expresado como incremento (Δ) del área de la colonia entre los días 2 y 3, relativo a wt. Se inocularon 10⁶ microconidios en el centro de una placa Petri con medio MM. Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. * P=0.05, ** P=0.01, *** P=0.001 según la prueba de Dunnett. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

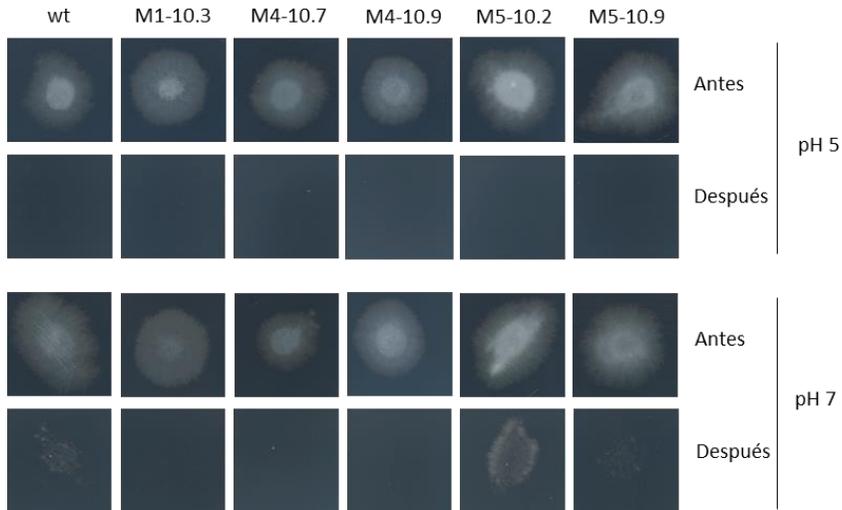


Figura 72. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en planta muestran crecimiento invasivo a pH 5. Se inocularon 5×10^4 esporas de las cepas indicadas en el centro de placas de medio mínimo cubiertas con una membrana de celofán y tamponadas a pH 5 o 7 con 100 mM MES y se incubaron 3 días a 28 °C (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y se incubaron un día más para determinar la presencia del hongo en el medio (después).

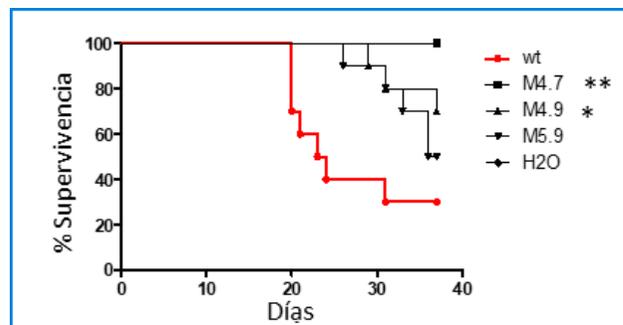


Figura 73. Supervivencia de plantas de tomate (cultivar Mónica). Grupos de 10 plantas se inocularon con $2 \cdot 10^6$ microconidios/ml de los aislados monospóricos con origen las poblaciones evolucionadas en MM. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 35 días tras la inoculación. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. El análisis estadístico se realizó según el test Log-Rank (Mantel-Cox) donde *** $p < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$ respectivamente.

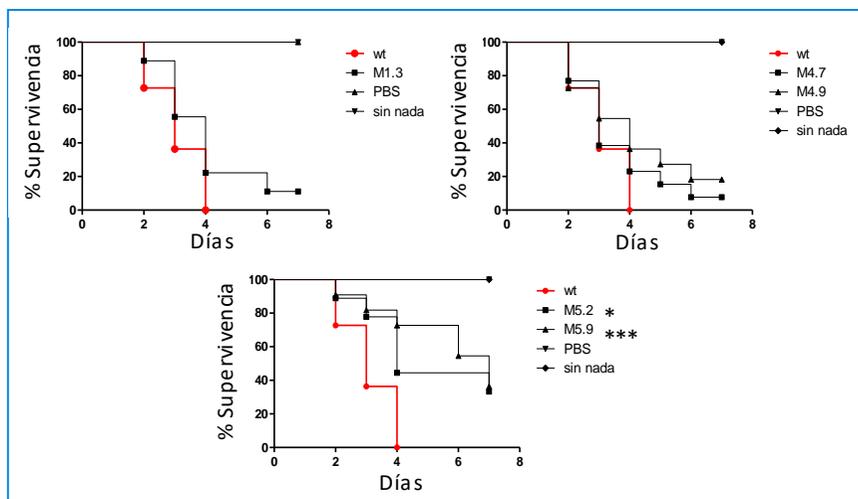


Figura 74. Ensayo de infección en larvas del gusano de la miel (*Galleria mellonella*). Grupos de 15 larvas se inocularon con $1.6 \cdot 10^4$ microconidios totales de los aislados monospóricos indicados, obtenidos de las poblaciones evolucionadas en medio mínimo, mediante un microinyector. Como controles se utilizaron la cepa silvestre (wt) y larvas inoculadas con la solución salina (PBS). Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 7-9 días. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$, según el test Log-Rank (Mantel-Cox).

22.2.2. Resultados para los aislados seleccionados en la condición experimental de medio completo.

Del mismo modo que en las otras dos condiciones anteriores, En la tabla 26 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los distintos análisis fenotípicos realizados con los aislados obtenidos a partir de las poblaciones evolucionadas en medio completo. Los resultados experimentales se muestran en las figuras a continuación de la tabla.

Tabla 26. Resumen de los resultados fenotípicos de los distintos aislados analizados obtenidos a partir del ultimo pasaje de la evolución experimental en medio completo.

	Estreses				Conidiación		Celofán		Vel. creci	Infección	
	CFW	Med	NaCl	34°C	MM	pH 5	pH 7	MM	Planta	Larva	
Y1-10.1	--		+		+	-	+	+++		-	
Y1-10.4	--		+			-	+	+++			
Y2-10.4	--		-			-	-	+++	-	-	
Y2-10.6	--		--		+++	-	-	+++	-	--	
Y3-10.6	--		--		+++	-	-	+++			
Y3-10.10	--	-	-		+++	-	-	+++		-	
Y4-10.6	--	-	--		+++	-	-	+++			
Y4-10.8	---	-	-		+++	-	-	+++		---	
Y5-10.3	---					-	-	+++	-		
Y5-10.9	--		--			-	+	++	-	--	



Entre los cuatro tipos de estreses analizados nuevamente el que mostró producir un mayor efecto diferencial en los aislados analizados fue el estrés de pared por CFW. Como puede observarse en la Figura 75, la mayoría de los aislados evolucionados en medio completo crecieron de manera más restringida en presencia de CFW, Los aislados más afectados fueron Y4-10.8 e Y5-10.3.

En el estrés oxidativo no hubo grandes variaciones en el crecimiento entre los distintos aislados y la cepa silvestre, a excepción Y3-10.10; Y4-10.6; Y4-10.8 que mostraron una mayor inhibición. Para el estrés salino se observó nuevamente grandes diferencias entre los distintos aislados, los dos aislados de la línea Y1 crecieron algo más que la cepa wt mientras que el resto de aislados estuvieron afectados en el crecimiento excepto Y5-10.3 del que no se observaron diferencia respecto al wt (Figura 75). En el último de los estreses analizados, temperatura nuevamente no se observaron diferencia en ninguno de los aislados (Figura 75).

En la capacidad de conidiación sumergida, evaluada a los dos días tras la inoculación, se detectaron diferencias significativas según el test de Dunnet. Los resultados mostraron diferencias significativas para los aislados Y2-10.6; Y3-10.6; Y3-10.10; Y4-10.6 e Y4-10.8 ($P=0,001$) e Y1-10.1 (Figura 76.A). Para la velocidad de crecimiento los resultados fueron muy similares a los obtenidos en la otra condición de evolución experimental de medio mínimo con un incremento del área analizado significativamente mayor al obtenido en wt en todos los aislados analizados (Figura 76.B).

El último ensayo de este bloque determinó posible papel de las distintas mutaciones en la capacidad de traspasar una membrana de celofán. La cepa wt traspasa el celofán a pH 7 pero no a pH 5. De todas los aislados evolucionados en planta solo cuatro se comportaron de manera análoga a la cepa silvestre Y1-10.1, Y1-10.4 e Y5-10.9, mientras que los restantes no fueron capaces de penetrar el celofán en ninguna de las dos condiciones (Figura 77).

Finalmente, en los ensayos de infección de plantas de tomate, realizado solo para algunos aislados, se vio que el aislado de la línea Y1 se comportó ligeramente más rápido de la cepa silvestre pero no significativamente según el test estadístico utilizado para la supervivencia (Figura 78). El resto de aislados analizados fueron más lentos en la infección con una supervivencia de entre el 70-80% de las plantas infectadas el día 38. En el otro ensayo de infección con *G.mellonella* la mayoría de aislados infectaron más lentamente que la cepa silvestre wt. Según las líneas, en Y1 solo el aislado Y1-10.1 fue significativamente más lento (Figura 79). En la línea Y2 se observó un resultado muy distinto entre los dos aislados ensayados, mientras que Y2-10.4 fue algo más rápido en la infección el otro aislado Y2-10.6 se comportó de manera opuesta donde aproximadamente el 30% de las larvas estaban vivas el día 7. En la línea Y3 nuevamente solo un aislado fue más lento Y3-10.10 mientras que el otro Y3-10.6 se comportó de manera similar al wt. La línea 4 fue donde se encontró el aislado

menos virulento Y4-10.8 donde la mortalidad se empezó a registrar a partir del día 3 y el 40% de las larvas habían sobrevivido el día 7 y en la línea Y5 el aislado Y5-10.9 fue nuevamente significativamente más lento. En el estudio de infección de *G.mellonella* también se incluyeron los mutantes nulos para los genes FOXG_21009 y velB. En este caso el mutante VelB se comportó muy similar a la cepa wt pero el obtenido en el gen FOXG_21009 si fue significativamente más lento, con un retraso claro de la infección que determinó que todas las larvas infectadas con este mutante murieran el día 6 frente a al cuarto día del wt.

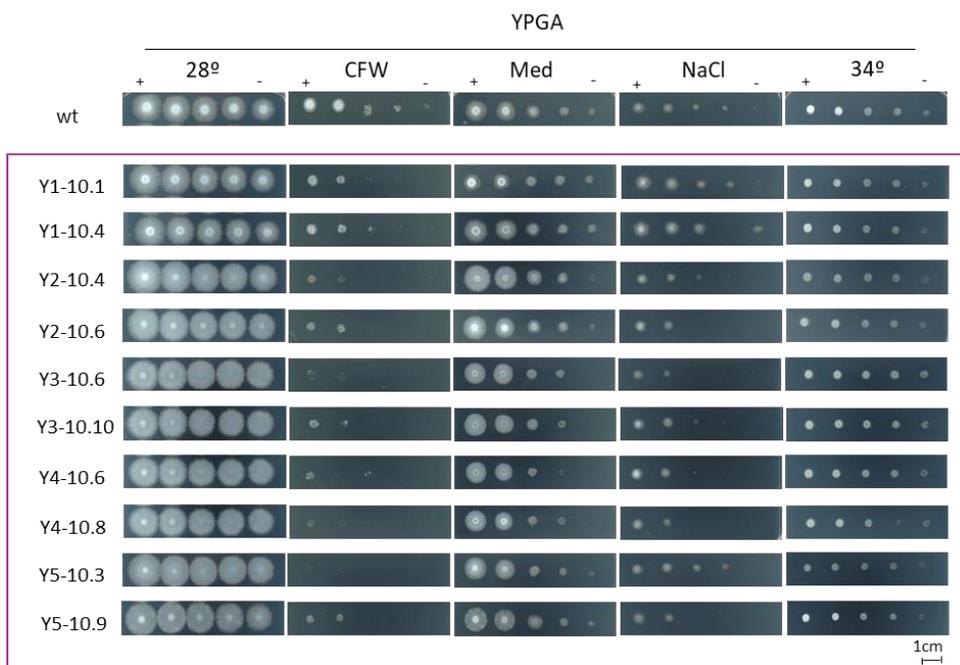


Figura 75. Fenotipos de respuesta a estreses de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo. Crecimiento de los aislados indicados en placas de medio YPGA en condiciones óptimas (28°C), de estrés de pared (50 µg/mL Calcoflúor White), oxidativo (10 µg/mL Menadiona), salino (1,5M NaCl) y de alta temperatura (34°C). Las placas se incubaron 2 días, excepto YPGA a 34 °C que se incubó 3 días. La barra de tamaño indica 1 cm.

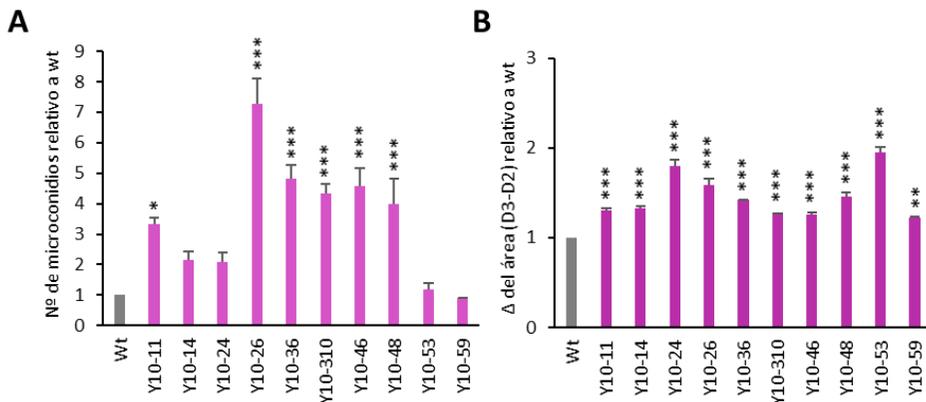


Figura 76. Producción de microconidios y velocidad de crecimiento de distintos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo. (A) Número de microconidios producidos por los aislados indicados, en cultivo sumergido en medio mínimo líquido tras 2 días de incubación a 28°C y 170 rpm. Se inocularon $5 \cdot 10^6$ microconidios/mL. **(B)** Velocidad de crecimiento expresado como incremento (Δ) del área de la colonia entre los días 2 y 3, relativo a wt. Se inocularon 10^6 microconidios en el centro de una placa Petri con medio MM. Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. * $P=0.05$, ** $P=0.01$, *** $P=0.001$ según la prueba de Dunnett. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

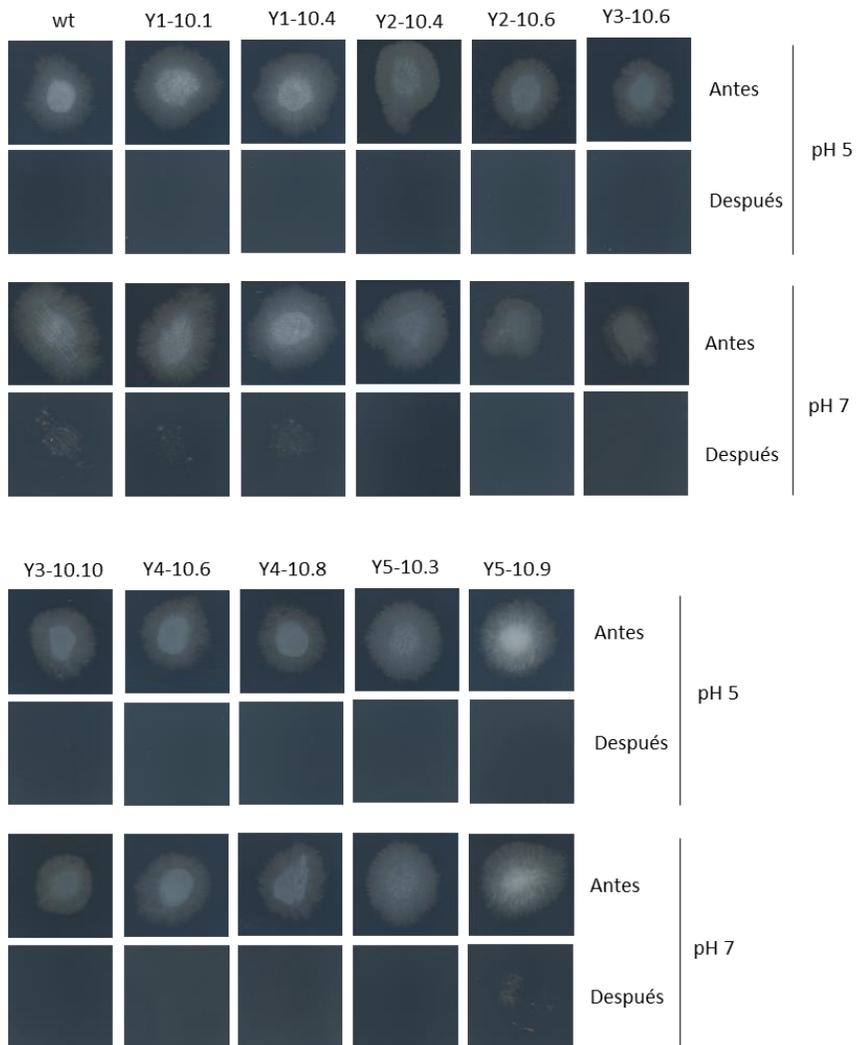


Figura 77. Algunos aislados monospóricos obtenidos de poblaciones evolucionadas en medio completo muestran crecimiento invasivo a pH 5. Se inocularon 5×10^4 esporas de las cepas indicadas en el centro de placas de medio mínimo cubiertas con una membrana de celofán y tamponadas a pH 5 o 7 con 100 mM MES y se incubaron 3 días a 28 °C (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y se incubaron un día más para determinar la presencia del hongo en el medio (después).

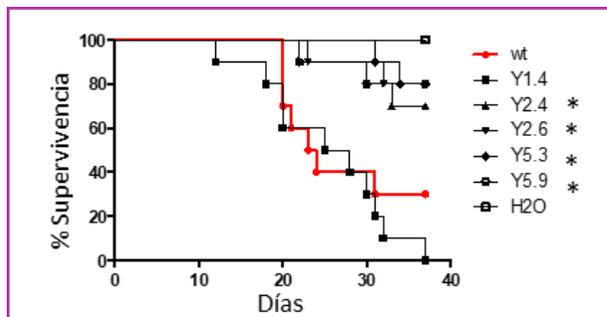


Figura 78. Ensayo de infección en plantas de tomate (cultivar Mónica). Grupos de 10 plantas se inocularon por inmersión en una suspensión de $2 \cdot 10^6$ microconidios/ml de los aislados monospóricos indicados, obtenidos de las poblaciones evolucionadas en plantas. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 35 días tras la inoculación. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$, según el test Log-Rank (Mantel-Cox).

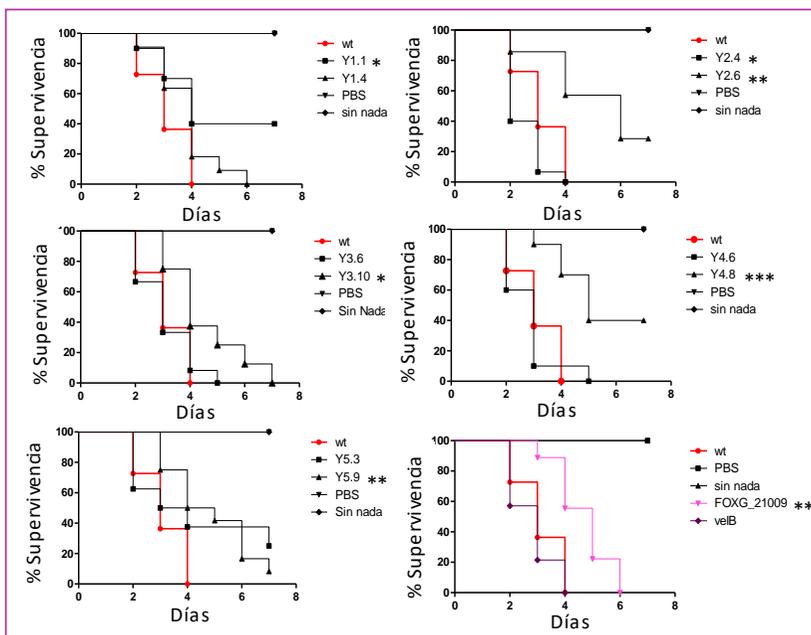


Figura 79. Índice de supervivencia de larvas de la miel (*Galleria mellonella*) inoculadas individualmente con un microinyector en grupos de 15 larvas con $1.6 \cdot 10^4$ microconidios totales. Se representa el índice el porcentaje de supervivencia de los aislados monospóricos de las cinco líneas poblacionales generadas en medio completo YPGA. Como control se utilizó la cepa silvestre de inicio (wt) y larvas inoculadas con la solución salina sin microconidios (PBS) evaluadas a lo largo de 7-9 días. Los datos mostrados corresponden a experimentos representativos con al menos dos repeticiones y resultados

similares en todos los casos. El análisis estadístico se realizó según el test Log-Rank (Mantel-Cox) donde *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$ respectivamente.

Discussion

23. Discussion

The present work initiated a new research line on experimental evolution in our laboratory. The study of three different environmental conditions, each with five independently evolved lines has generated a wealth of information, whose partial analysis is presented in this manuscript.

23.1. Rationale and initial setup of the experimental evolution experiment.

F. oxysporum is a soilborne plant pathogenic fungus adapted to a wide variety of environmental conditions. As a transkingdom pathogen, it is capable of infecting both plants and animals (Ortoneda, et al 2004), which makes it an ideal model to study genetic changes related to environmental specialization and adaptation. To understand the nature and frequency of these changes, the first focus of the work was the identification and quantification of growth variants that arose spontaneously in plate-grown colonies of the strain Fol 4287. Previous studies carried out in our laboratory suggested that these growth variants, identified as colony sectors, carried large scale genetic changes related to chromosomal rearrangements (Elena Pérez Nadales et al., unpublished). However, the reproducibility of these phenotypes as well as their frequency had not been confirmed. The results shown in the first chapter of this Thesis show that the strains of *F. oxysporum* analysed here which belong to a number of “*formae speciales*” generate different frequencies of growth sectors. We also found remarkable differences in a number of knockout mutants of the Fol 4287 strain from our collection. Surprisingly, we found a high percentage of strains that did not form sectors, which could mean that these strains are genetically more stable. However, the mutation rate and the frequency of sectors do not have to be necessarily equivalent.

A detailed study of the sectors generated on minimal medium plates with different sources of nitrogen confirmed that these growth variants display phenotypic changes which are clearly identifiable in the different media used (PDA, MM + glu and MM + met). Our results did not allow to associate specific growth phenotypes to the environmental conditions where they were identified, because similar phenotypes were isolated from media with different nitrogen sources. Therefore, with the obtained data it was not possible to establish patterns between sector phenotypes and specific growth conditions.

The phenotypic analysis of the different growth variants revealed clear differences with respect to the original strain from which they were isolated. This suggests that there could indeed be genetic changes, that could be associated not only with specific mutations but also with epigenetic changes affecting gene expression. In the absence of sequencing data from the available growth variants, in the results from that analysis of these sectors we confirmed the existence of phenotypic and genetic variability, including conidiation capacity in minimal medium or the capacity of infection on an invertebrate animal host. Moreover, CHEF electrophoresis of the chromosome patterns suggested the existence of large chromosomal rearrangements. Based on these results, the question underlying this work was: How do certain environmental conditions affect the selection of spontaneous mutations within the framework of adaptive evolution?

In order to investigate this, experimental evolution experiments with ten serial passages were carried out in three different environmental conditions. Recent advances in DNA sequencing technologies have now made it possible to identify genetic changes between the ancestral organism and experimental derivatives at a full-genome scale (Winzeler, *et al* 1999, Civelek & Lusic, 2014, Lang, *et al* 2013). The use of this approach has allowed us to make a survey of the mutations that occurred and were selected for in the conditions of tomato plant infection, as well as on complete or minimum media plates.

23.2. Dynamics of adaptive evolution in *F. oxysporum*

In general, the number of mutations identified in the evolved populations was relatively low in the three experimental conditions. However, it must be considered that the sequencing analysis was only carried out on the last passage populations. That is, only those mutations that were detectable in the population at that time have been registered, but not those that have arisen and disappeared during evolution.

Evolutionary adaptation is driven by the accumulation of beneficial mutations (Tenaillon, *et al* 2012, Woods, *et al* 2006, Saxer, *et al* 2010). The traditional view is that this dynamic is dominated by rare beneficial mutations that occasionally survive drift and increase their frequency until they are fixed, also known as "selective sweep" (Atwood, *et al*, 1951; Paquin, *et al* 1983). This implicitly assumes that at most one single beneficial mutation is present in the population at the same time. The evolutionary dynamics of the different mutations found in our experimental conditions do not support this idea, in agreement with recent results obtained in evolved populations of bacteria, yeasts and viruses of small genome size (Joseph & Hall, 2004; Perfeito, *et al* 2007; Lang, *et al* 2013), where the rates of beneficial mutations were high enough for multiple mutations to spread simultaneously in the population. Similarly, we found multiple mutations arising and being fixed at the same time, for example in the populations P2, P3 and P5 evolved in plants. This type of groupings called "cohorts" can be mutations that are not functionally related, escape synchronously from the drift and are closely tracked with each other over time (Lang, *et al* 2013). The only cohort found in the P2 line confirmed this effect in the two simultaneous mutations fixed in the first passage, since one of these was produced by the insertion of a TE in the CDS and the other event is a small 20 pb deletion located in an intergenic region. By contrast, in line P5 each of the four mutations in the cohort directly affect a gene. Interestingly, in this case three of

the mutations were caused by the insertion of a TE and the fourth was an insertion of 4 pb coinciding with a footprint left by the jump of a TE, suggesting a possible link between the latter and any of the other three events.

Undoubtedly the most complex and possibly the most interesting experimental condition carried out is the infection of tomato plants. During plant-pathogen interactions, multiple scenarios can develop during the infection of a host plant (Ferreira *et al* 2006, Hernández-Chávez *et al* 2017, Shetty *et al* 2007). As a consequence, the adaptive capacity of the pathogen during the cycle of infection is conditioned by multiple ecological environments. Our experimental approach aims to understand how direct reiterative passaging through the host plant affects a pathogen that is already successfully adapted at the start of the experiment. The question how this scenario can condition adaptive selection is not trivial, because beneficial mutations for one specific infection condition may not be beneficial in a different condition (Winzeler, *et al*, 1999; Baba, *et al* 2006; Koo, *et al* 2017; Pache, *et al* 2009). From a very general point of view the mutations selected in this experimental condition should suppose an adaptive improvement in root infection and colonization of the tomato vascular tissue. A functional analysis of the mutated proteins found in the evolved populations suggests that they are related to the cell wall stability, osmosis and energy balance. A priori, it is not clear how these mutations can improve the fitness of the organism in an environment that is changing during infection. It is possible that multiple adaptive mutations can be selected for in the plant due to its multistage condition? This might be the case, for example, in the evolved population of line P2 where mutations undergo what we could call periodic selection (Barrick & Lenski, 2013; Atwood, *et al* 1951), that is, five mutations produced at successive points of evolution without apparent interference between them (Ossowski, *et al* 2010; Keightley, *et al* 2009; Denver, *et al* 2009), all of which became fixed in the population. The first two mutations were mentioned previously for their cohort trait. In addition, a new mutation became

fixed in a single passage indicating that it confers a clear advantage over the ancestor and therefore can be classified as "innovation". Intriguingly, the "innovations" occurred in the first two groups of mutations that arose in passage 1 and 3, whereas the fixation of two following mutations occurred at a slower pace following the dynamics of an "optimization" (Barrick & Lenski, 2013). This could indicate that subsequent mutations become less competitive as they arise in the background of increasingly efficient lineages. The confirmation that the mutations selected during plant passaging confer a selective advantage for the infection was obtained by co-infecting an equal amount of conidia of a monosporic isolate obtained from P2 together with the wt. Importantly, the evolved isolate was more efficient in colonizing the plant than the wt (a trait selected for in the experimental evolution), but did not exhibit increased virulence and incidence of disease (which was not selected for).

The results in the rest of the lines evolved in tomato plants are less clear than those of P2. For example, in line P4 and P5 the competition between the mutations analysed determines the speed at which they propagate through the passages in the population, as new mutations must displace competitors more in a way that has arisen before and not just their ancestor (Fogle, *et al* 2008). This effect, termed clonal interference, has been reported in several deep sequencing studies in yeast populations by following the frequencies of multiple new mutations (Lang, *et al* 2013). Consequently, the frequency of an allele of a given gene can change drastically throughout evolution without an apparent relationship with the derived protein function, but rather within the context of the population where it arises and develops (Nei, *et al* 2005; Steenackers, *et al* 2016).

The most complex case is line P3, which was mixed by accident with P5 halfway through the experimental evolution passages. This provided the possibility to follow the events occurring after two different genetic lineages with

a common origin intersect and evolve together. The analysis of the P3 + P5 mixture represented a new stage in the adaptive evolution experiment, where two partially adapted populations coevolve without mutual gene flow. This suggests that both lineages already incorporated mutations before the mixture, allowing them to improve their fitness, leading to a competitive equilibrium between the two. In second possible scenario, a cooperative relationship could be established between both populations. This strategy would infer an adaptive improvement, where the beneficial effects of the mutations acquired independently by the populations are additive. where a heterogeneous community develops strategies to be more competitive jointly. In our study, this second hypothesis was partially confirmed by genotyping ten monosporic isolates obtained from the last passage of experiment, where individuals of each of the two lineages were identified at similar proportions (6/4). Moreover, this analysis revealed that new mutations arising after the mixing occurred either in one or the other, but not in both of the two genetic backgrounds. The fact that none of the new mutations resulted the displacement of the other population reinforces the idea of the two "collaborative communities".

Another of the general questions posed by a study of adaptive evolution is whether specific phenotypes are selected preferentially under certain conditions. During evolution on complete medium plates, two recurrent mutations were selected independently and in the same order in several lines. The first, a transposon insertion in the *FOXG_21009* gene, occurred at the beginning of the experimental evolution in four of the five lines studied. In three of these, we can consider this event to fit the concept of innovation, because it was fixed very quickly. To further test this idea, obtained monosporic isolates carrying these mutations and generated a null mutant in the gene. These two complementary approaches allowed us to determine that the main fitness gain of these mutations is a significant increase in growth speed and conidiation. Interestingly, in contrast to lines Y2-Y4, this mutation did not become fixed in line

Y5. Rather, the frequency in the population remained more or less constant throughout the experiment. A possible explanation could be the appearance of another, not yet identified mutation, whose effect on the population could have limited the establishment of the first one without completely replacing it. Another interesting feature of this mutation, repeated in several lines, is that it is produced by the Hormin transposon itself. This transposon is the Hornet model and therefore you need to use the transposase of another transposon to jump. In the four lines the jump occurs in the ORF of the gene in different positions which causes a phase change in the sequence and therefore in the protein. In addition to the above, the confirmation that this gene with unknown function is target is in a new mutation in the M4 line of the experimental minimal medium condition. In this case, the mutation occurred in the area of the gene terminator with a possible implication in its expression and produced by the transposon hAT1. The change of the Hormin transposon type to hAT1 could be in the experimental condition. The study of the different types of transposons showed that the Hormin transposon was the most active both in the plant condition and in the YPGA medium, but not in the miniature medium whose jump was very reduced. This fact could explain that with a reduced activity of one type of transposon the blockade of the gene is done with another more active than in the case of the minimum medium it turned out to be hAT1.

The other interesting gene in the experimental evolution in the YPGA medium is velB. According to the sequencing data, the mutation in this gene was repeated in three of the four independent lines that had the other repeat mutation (FOXG_21009) in this condition. In this case, the mutation was caused by a nucleotide change (Y3, Y4) and a small deletion (Y2) in the ORF of the gene that generated in all cases a stop codon. With the evolutionary dynamics of both mutations we were able to establish a clear evolutionary relationship where in all cases. The first mutation found was that produced in the FOXG_21009 gene followed by the velB mutation, always in later passages and subject to fixation in

the population of the first event. The confirmation of this statement is in the fact that the only line where the *velB* mutation was not incorporated was precisely in line Y5 where the frequency of the population only reached values close to 25%. To this we must add that in the only line of the minimum medium where the jump of an M4 transposon was detected (FOXG_21009) another mutation in the *veA* gene was also detected. Both *velB* and *veA* are part of the same gene family of the velvet complex (Mooney & Yager, 1990). Both genes under dark conditions interact in the cytoplasm and enter the nucleus to bind there to a primary regulator of secondary metabolism, (Lae protein). The possible implications of the effect of the *velB* mutation within this context of experimental evolution are not clear because its relationship with the first mutation in FOXG_21009 whose function is unknown must be taken into account. The first thing that draws attention to the *velB* mutation produced on the new carrier line of the FOXG_21009 mutation is that it maintains the growth rate phenotype equal. This indicates that the first mutation is dominant over the second for this phenotype since the null mutant *velB* grows more restrictively. On the other hand, although the capacity of conidiation is increased, this effect does not seem important enough to occur repeatedly in the different independent lines. One of the possible explanations is that the second mutation plays a role not so much of adaptive improvement but rather of metabolic rebalancing. The role of *velB* in fungi has been described sufficiently in the literature, is involved in multiple metabolic pathways between which the production of secondary metabolites according to light and darkness (Calvo, 2008) and the regulation of the sexual cycle (Bayram, 2008). In the absence of a known sexual cycle in *F. oxysporum* we propose the hypothesis of a regulation of secondary metabolites by blocking one of the Velvet complex genes. During plaque evolution, the synthesis of secondary metabolites involved in host infection seems an unnecessary energy expenditure. This added to a possible increase in energy expenditure caused by the first mutation, with a faster growth and greater capacity of conidiation, suggests that

the mutation in *velB* causes an effective energy readjustment in the experimental condition.

23.3. Particularities of the experimental condition in minimal medium

Of the three conditions analysed, the one performed in the medium of minimum growth was the one with the lowest number of mutations. In addition, these mutations were found only in four of the five lines analysed since no events were detected on line M2. The lack of mutations found was the first evidence of control over mutations. In this context, two ideas emerge that may explain this unexpected result. The first hypothesis explains the absence of mutations in the last passage of the M2 line because there have been no evolutionary advantages that displace the ancestor. This would mean that, although spontaneous mutations had occurred throughout evolution, they would not have been fixed in the population and therefore were not detected in the last passage when sequencing. In this case, it could be called passive regulation obtained from the absence of selection on the mutations that have arisen. The other hypothesis would be just the opposite idea, that is, that there has been active control over mutations or active regulation. This process would be carried out if there were too many deleterious or negative mutations that put the viability of the population in this condition at risk. According to this hypothesis, there should be some type of cellular communication, possibly with biochemical signals, that would alert of an excess of mortality caused by these mutations. It is true that in the rest of the lines studied some mutations were found, although it is surprising that in a poor environment that should be stressful there are too many selected "neutral" mutations found in intergenic spaces. On the other hand, our results of the evolutionary dynamics indicate that these mutations would have occurred in the first passages of experimental evolution, which would not invalidate this

theory for the last phase of the experiment. The next question that arises is what type of regulation could be occurring? The mapping with respect to the reference sequence of the M2 line revealed small duplicated zones in all the chromosomes. A more exhaustive study (Ayhan, unpublished) revealed that these zones correspond to centromeres sequences and, consequently, the cell cycle could be affected. All this supposes to speculate on what is happening, but they would go in the line of possible changes in the chromatin and consequently a mode of active regulation. It is known that stress mainly affects facultative heterochromatin (Trojer & Reinberg 2007), whereas constitutive heterochromatin is usually associated with regions rich in ET and poor in genes that maintain repression (Dillon, *et al* 2004; Saksouk, *et al* 2015). A regulation of the chromatin agrees with the type of TE selected in minimum medium differs not only in number but also in the type of TE selected. While in the plant and complete medium conditions the most abundant TE selected was Hormin and Fot1 in minimal medium was hAT1. This could be because the distribution of TE families or specific copies of a TE can be strongly correlated with the state of the local chromatin (Lanciano & Mirouze 2018) and therefore the condition of the chromatin of the condition in minimal medium could be different from the other conditions.

23.4. Role of transposons in evolution

The genome study of Fol 4287 determined that most LS regions contain more than 74% of the identifiable transposable elements (Ma & Van der Does *et al* 2010). This leads us to think that most TE jumps should be associated with these specific chromosomes of *F. oxysporum*. However, our results indicate that at least the TE jumps selected in the adaptive evolution of our experiments have been dispersed throughout all the chromosomes. Therefore, it has not been possible to find more active regions beyond what was explained above for the

FOXG_21009 gene. From a general point of view, we can conclude that the greatest source of variability in the three conditions was produced by TE. TE activity is largely associated with environmental stress, although the regulatory mechanisms underlying the repression are poorly understood (Fouché, *et al* 2019). The unresolved key questions are whether different types of stress differentially induce TE activity and whether different TE respond differently to the same stress.

Most of the jumps of these transposons in the chromosomes have generated a great variability in all adaptive environmental conditions through the inactivation of genes, the variation of the number of copies of the genes or a possible implication in the altered gene expression.

Another source of variability has been found in the large deletions flanked by TE found in lines P3 and P5 of plants and M3 of minimal medium. In this case, the possible associated mechanism could be Single Strand Annealing (SSA). This mechanism is a repair route for double-strand DNA (DSB) break that uses homologous repeats to join the ends that have been broken. Its influence is difficult to fully assess, but SSA events have been demonstrated in mammalian cells and in several model organisms, including *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *D. melanogaster* and *C. elegans* (Ivanov, *et al* 1996; Do, *et al* 2014; Orel *et al* 2003; Pontier, *et al* 2009). The SSA involving repetitions that flank a single DSB causes a reorganization with the elimination of the sequence contained between the repetitions (Bhargava, *et al* 2016). In our case, the deleted areas produced a sequence loss between 28 KB and 35 Kb with the elimination of between 11 and 13 genes. Although this mechanism of repair is often the interesting thing in this case is that despite a high number of genes, these events increased their frequency in the population to be fixed in two of the three cases found. This indicates that the loss of these genes is an adaptive advantage.

Apart from these individual examples of repeated rearrangements, it is difficult to fully assess the influence of SSA on chromosomal rearrangements, one of the main reasons is that current next-generation sequencing approaches are often insufficient for comprehensive detection of rearrangements that involve repetitive elements (Weckselblatt, *et al* 2015), which are the likely result of the SSA. However, a recent genome-wide analysis of variations in the number of human copies identified several inherited chromosomal rearrangements that are mediated by long interspersed element repeat sequences (LINE) (Startek, *et al* 2015). This could be the case of the CNV found on chromosome 13 where a sequence of another type of Skippy retrotransposon (LTR) has been detected in each of the two copies found (Ayhan, unpublished).

Copy number variants are defined as duplications or deletions ranging from 50 base pairs to complete chromosomes and can significantly influence phenotypic diversity (Lieber, *et al* 2008; Riethman, *et al* 2009; Zhang, *et al* 2009; Arlt, *et al* 2014). Here we have identified 3 types of CNVs associated with large deletions in region 1 & 15 and end of chromosome 13 together with a duplication associated with region 3 & 6. Another possibility associated with the loss of a copy may be that generated from aberrant DNA repair (Hastings, *et al* 2009; Hull, *et al* 2017). The repetitiveness of the event, as is the case of the deletion of chromosome 15, suggests that this could be due to the fact that the split copy presents some type of structural weakness not identified to date.

In the case of the duplication found in chromosomes 3-6, the specific areas where it starts, and ends are unknown or if it is associated with one of the two chromosomes or one of them. This is due to the problems derived from the multiple repeated sequences that are difficult for the correct assembly of these chromosomes. The reasons why such a large region is duplicated are not clear, in fact they suppose a metabolic effort that nevertheless has previously been described in other organisms. This was the case of the duplication found in

Candida albicans where a duplication of chromosome 5 was found associated with the resistance of an antifungal agent. (Selmecki, *et al* 2006). The association to a certain stress is not clear according to our results since this duplication was found in all the conditions tested. Specifically, P3 (Plant) Y1 and Y5 (complete medium) and M1, M3 and M5 (minimum medium). But it has been seen that a possible strategy, origin of the duplications, could be in finding functional divergence of the gene duplicates (for example, by subfunctioning or splitting a set of ancestral functions through duplicates, including the evolution of new functions (neofunctionalization) (Lynch & Conery, 2000; Soria, *et al* 2014; Reams & Roth 2015).

23.5. Analysis of monosporic isolates

The phenotypic analysis of the monosporic isolates of the different phenotypes allowed to demonstrate that the most influenced characteristics in the evolution in solid medium are those directly related to the selection condition that this case can be considered the capacity of plate conidiation and the speed of growth. Our results demonstrated that these two characters were clearly improved in the evolution with high significant differences between the wild strain of origin and the different plaque isolates. The reproducible character in both evolutionary conditions MM and YPGA reinforces this idea. On the other hand, the results for the isolates obtained from plants medium the effect on these two phenotypes growth rate and conidiation was on the contrary. All isolates analysed or behaved similarly to wt or lost conidial capacity, which we believe indicates that the minimal use of isolation media (PDA) and growth (PDB) during experimental evolution influenced little or nothing in the selection of the mutations found in the last passage. That is, the mutations were due to the selective pressure produced by the direct contact of the host during the infection.

Another interesting aspect of the phenotypic analysis is found in the results obtained in the infection of the main host or tomato plant and the secondary host or larvae of *G. mellonella* (Navarro-Velasco, *et al* 2011). The first analysis of infection of the different populations already revealed interesting data as that the populations evolved in the plant did not present a remarkable improvement compared to the wt in the tomato infection, but a loss of pathogenicity in the infection of *G. mellonella*. Although these early data were already revealing, the results could be biased by a heterogeneous population where non-pathogenic individuals would be covered up by the rest. This effect was clearly seen in the subsequent analysis of monosporic isolates from these populations. For example, in line P5 where there were no significant differences with respect to the wt strain in the population, one of the isolates was clearly less pathogenic. This leads us to think that the degree of specialization of the secondary host has occurred later in the evolution of *F. oxysporum*. This could be the reason why in all environmental conditions it preferentially loses this ability to cause disease in animals.

23.6. Fusaric acid

The regulation of FA production has been studied for almost 80 years. Initially, it was proposed that FA was mainly produced under alkaline conditions (Yabuta *et al.*, 1939), whereas later studies suggested that nitrogen sufficiency and slightly acidic media were optimal for FA production (Pitel & Vining, 1970). Here, we hypothesized that pH could act as a key regulatory factor and observed significantly higher *fub1* expression and FA production at pH 5 relative to pH 7. Our results are in contrast with those reported in *F. fujikuroi*, showing a higher expression of *fub1* at pH 8 relative to pH 4, requiring the alkaline pH regulator PacC (Niehaus *et al.*, 2014). We also confirmed that PacC is required for full expression of *fub1* at both pH 5 and pH 7. The seemingly contradictory results between *F. oxysporum* and *F. fujikuroi* could be explained by the different

experimental conditions used in the two studies: 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)-buffered versus unbuffered media, respectively (Niehaus *et al.*, 2014). It is known that the pH of an unbuffered culture can change rapidly during fungal growth. However, the optimum pH for *fub1* expression and FA production in *F. oxysporum* could be around pH 5 or higher, a range in which PacC is still active. In line with this hypothesis, *pacc* transcript levels were similar at pH 5 and pH 7, but almost undetectable at pH 4 (Caracuel *et al.*, 2003). The global regulator of secondary metabolism LaeA (Bok and Keller, 2004; Butchko *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2010) has been shown previously to regulate FA production in *Fusarium* (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014). In line with previous reports suggesting a positive role of LaeA in FA biosynthesis (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014), we showed here that the inactivation of LaeA leads to a significant decrease in chromatin accessibility at the FA gene cluster. These findings, together with the reduced expression of the *hph* gene when inserted at the site of *fub1*, suggest a major regulatory function of LaeA in remodelling chromatin structure at the *F. oxysporum* FA locus. In addition, we showed that moderate acidic pH and PacC contribute to an increase in chromatin accessibility at the *fub1* locus. Although our data suggest that this contribution requires LaeA, this remains to be confirmed experimentally. The fact that inactivation of LaeA has, by far, the strongest effect on the expression of the FA gene cluster and FA production suggests that other stimuli, such as nutrients or pH, may converge on this master regulator of secondary metabolism to regulate expression of the gene cluster.

FA has long been known for its ability to chelate metal ions (Lakshminarayanan and Subramanian, 1955; Malini, 1966; Pan *et al.*, 2010; Tamari and Kaji, 1952). However, the regulation of FA biosynthesis by metals has not been studied so far. Here, we showed that transcript levels of *fub1* are negatively regulated by copper, iron or zinc. Although this suggests that FA might function in metal uptake, we found that *fub1* was not essential for the growth of

F. oxysporum in copper-, iron- or zinc-limiting conditions, most probably because more specific and efficient uptake mechanisms are present in filamentous fungi, such as high-affinity copper and zinc transporters (Park *et al.*, 2014; Vicentefranqueira *et al.*, 2005) and siderophore-assisted iron uptake (Schrettl and Haas, 2011). Alternatively, metal-chelating FA might be used by *Fusarium* to inhibit microbial competitors in the soil or to improve growth at toxic metal concentrations. However, we found that a lack of FA production was not detrimental during fungal growth in toxic copper, iron or zinc conditions.

Early studies established the phytotoxic activity of FA and its role in the induction of wilt symptoms in plants (Gäumann, 1957, 1958; Yabuta *et al.*, 1937). Our study confirmed that tomato seedlings develop typical wilt symptoms when their roots are exposed to FA. The fact that wilting was observed in the cotyledons and lower leaves suggests that FA is transported and distributed throughout the entire plant. Similar wilt symptoms have been reported in water melon seedlings (Hong-Sheng *et al.*, 2008).

The precise mechanism of phytotoxicity of FA remains unknown. A number of studies have suggested that it could be related to its ability to chelate different metal ions (Gäumann, 1958; Lakshminarayanan and Subramanian, 1955; Ruiz *et al.*, 2015; Tamari and Kaji, 1952). Here, we showed that the addition of copper, iron or zinc to FA-treated plants significantly reduces wilting. Importantly, the inhibition of FA toxicity was also functional when the metal ions and FA were applied to different parts of the plant (leaves and roots, respectively), indicating that the chelating mechanism occurs inside the plant. This is further supported by the fact that the membrane-permeable metal chelator TPEN, but not the membrane-impermeable chelators BPS or BCS, was able to exert a toxic effect similar to that of FA. Although additional mechanisms of FA toxicity cannot be ruled out, our results clearly support a causal link between FA phytotoxicity and metal chelation.

Previously, the mycotoxin Bea has also been shown to contribute to infection of *F. oxysporum* in plants and mice. This suggests that the production of secondary metabolites, many of which are regulated by the Velvet complex and LaeA, could play a role in the capacity of *F. oxysporum* to attack both plant and animal hosts. In line with this idea, mutants lacking VeA or LaeA are significantly attenuated in virulence on tomato plants and mice (Lopez-Berges *et al.*, 2013), as are Velvet complex mutants in other human and plant pathogenic fungi (Bok *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Laskowski-Peak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Merhej *et al.*, 2012; Myung *et al.*, 2009; Webster and Sil, 2008; Wiemann *et al.*, 2010). Additional studies, including investigations on the combinatorial/synergistic effects of co-occurring mycotoxins, are required to fully understand the role of secondary metabolite production in the cross-kingdom pathogenicity of *F. oxysporum*.

Conclusions

24. Conclusions

1. This work represents a first step to understand the mechanisms of genomic plasticity of the multi-host pathogen fungus *F. oxysporum* in different environmental conditions.

2. Growth variants with different phenotypes spontaneously originate spontaneously during the growth of the wild strain Fol 4287 in minimal medium with different nitrogen sources.

3. The experiment of experimental evolution with ten serial passages of Fol 4287 by tomato plants or plates of minimal or complete medium, followed by a re-sequencing analysis has allowed to identify changes in the genome in practically all the analyzed populations.

4. The largest number of selected events was found in the most complex experimental condition, the plant.

5. Most of the mutations selected during the experimental evolution affect the CDS or the promoter region of the genes.

6. The movement of DNA transposons was the main source of genetic variability selected in the three conditions analyzed.

7. In the three selection conditions, the same CNVs located in three specific chromosomal regions were found.

8. Dynamics were observed with multiple events that were set successively in the population, illustrating the importance of both chance and selection to determine the results of evolution.

9. In the passages by plates with complete medium (YPGA), events in the same two genes were selected in the same order in multiple lines, suggesting

that, at least in this condition, there is a limited number of trajectories of adaptive evolution.

10. Most of the selected changes in plate conditions resulted in a significant reduction in the ability to cause disease in tomato plants or the *Galleria* invertebrate model.

11. Some of the lines evolved in tomato plants showed a significant reduction in virulence on *Galleria*, which suggests that there is a compensation in the virulence between the two types of hosts.

Bibliografia

25. Bibliografía

- Agrios, G.N.** Plant Pathology. San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc (2004)
- Alves-Santos, F.M, Benito, E.P, Eslava, A.P, Díaz-Mínguez, J.M.** Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3335-3340. (1999)
- Appel, D.J & Gordon, T.R.** intraspecific variation within population of fusarium oxysporum based of RFLP analysis of intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental mycology*. 19, 120-128. (1995)
- Appel, D.J & Gordon, T.R.** Relationships among pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of ribosomal DNA. *Molecular Plant-Microbe interactions*. 9, 125-138. (1996)
- Arlt, M.F, Rajendran, S, Birkeland, S.R, Wilson, T.E, and Glover, T.W.** Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells. *Environ. Mol. Mutagen*. 55,103–113. (2014).
- Atwood, K.C, Schneider, L.K, Ryan, F.J.** Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 37, 146–155 (1951)
- Baayen, R.P, O'Donnell, K, Bonants, P.J, Cigelnik, E, Kroon, L.P, Roebroek, EnJ, Waalwijk, C.** 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. (2000)
- Baba, T, Ara, T, Hasegawa, M, Takai, Y, Okumura, Y, Baba, M, Datsenko, K,A, Tomita, M, Wanner, B.L, Mori, H.** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol*. 2, 2006.0008 (2006).
- Bacon, C.W, Hinton, D.M, Hinton, A. Jr.** Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavenis* and other bio-control *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol*. 100, 185–194. (2006)
- Barrick, J.E & Lenski, R.E.** Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*. 14,827–839. (2013)
- Bhargava, R, Onyango, D.O & Stark, J.M.** Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet*. 32(9): 566–575. 2016

- Beckman, C.H.** The nature of wilt diseases of plants. *APS press*. (1987)
- Bentley, D.R, Balasubramanian, S, Swerdlow, H.P, Smith, G.P, Milton, J, Brown, C.G, et al & Smith, A.J.** Accurate whole human Genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 456(7218), 53–9. (2008)
- Besser, J, Carleton, H.A Gerner-Smidt, P Rebecca L. Lindsey, R.L, Trees, E.** Next-Generation Sequencing Technologies and their Application to the Study and Control of Bacterial Infections. *Clin Microbiol Infect*. 24(4), 335–341. (2018)
- Bok, J.W. & Keller, N.P.** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*. 3, 527–535. (2004)
- Bok, J.W, Balajee, S.A, Marr, K.A, Andes, D, Nielsen, K.F, Frisvad, J.C, Keller, N.P.** LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell*, 4, 1574–1582. (2005)
- Booth, C.** The genus *Fusarium*. *C.A.B.* (1971)
- Brocchieri, L.** Phylogenetic Inferences from Molecular Sequences: *Review and Critique*. *Theoretical Population Biology*. 59, 27-40. (2001)
- Buermans, H.P.J & den Dunnen, J.T.** Next generation sequencing technology: Advances and applications. *BBA Molecular Basis of Disease*. 1842(10):1932–41. (2014)
- Burnett, J.** Aspects of *Fusarium* genetics. *The applied mycology of fusarium Cambridge University Press, New York*: 39-69. (1984)
- Butchko, R.A, Brown, D.W, Busman, M, Tudzynski, B, Wiemann, P.** Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol*. 49, 602–612. (2012)
- Callow, J.A.** Models for host-pathogen interactions. *The applied mycology of Fusarium Ed, Cambridge University Press*: 39-69. (1987)
- Cameron, D.L, Schröder, J, Penington, J.S, Do, H, Molania, R, Dobrovic, A, Speed, T.P, Papenfuss, A.T.** GRIDSS: sensitive and specific genomic rearrangement detection using positional de Bruijn graph assembly. *Genome Res*. 27, 2050–2060. (2017)
- Caracuel, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., Gonzalez-Verdejo, C.I., GarciaMaceira, F.I. Di Pietro, A.** The pH signalling transcription factor PacC controls

- virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48, 765–779. (2003)
- Civelek, M. & Lusi, A. J.** Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 15, 34–48 (2014).
- Craig, N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, A.M.** Lambowitz, Eds. in *Mobile DNA II*, (American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 3–11. (2002)
- Clegg, M.T & Durbin, M.L.** Tracing floral adaptations from ecology to molecules. *Nat. Rev. Genet.*, 4(3), 206-215. (2003)
- Chin, C.S, Alexander, D.H, Marks, P, Klammer, A.A, Drake, J, Heiner, C, Clum, A, Copeland, A, Eichler, E.E, Turner, S,W, Korlanch, J.** Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Meth.* 10(6), 563–9. (2013)
- Conrad, T.M., Lewis, N.E, Palsson, B. O.** Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol. Syst. Biol.* 7, 509. (2011)
- Consortium, C. e. S.** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282(5396), 2012-2018. (1998)
- Czymmek, K, Fogg, M, Powell, D, Sweigard, J, Park, S, Kang, S.** 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. (2007)
- Daboussi, M.J & Capy, P.** Transposable elements in filamentous fungi. *Annu rev Microbiol.* 57, 275-299. (2003)
- D’Alton, A. & Etherton, B.** Effects of fusaric acid on tomato root hair membrane potentials and ATP levels. *Plant Physiol.* 74, 39–42. (1984)
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J, Foster, G.D.** The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. (2012)
- Denver, D.R, Dolan, P.C, Wilhelm, L.J, Sung, W, Lucas-Lledó, J.I, Howe, D.K, Lewis, S.C, Okamoto, K, Thomas, W.K, Lynch, M, Baer, C.F.** A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 16310–16314 (2009).

- Desjardins, A.E, Hohn, T.M, McCORMICK, S.P.** Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological reviews.* 57, 595-604. **(1993)**
- De Jonge, R, Peter van Esse, H, Maruthachalam, K, Bolton, M.D, Santhanam, P, Saber, M.K, Zhang, Z, Usami, T, Lievens, B, Subbarao, K.V, Thomma, B.P.** Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 109 (13), 5110–5115. **(2012)**
- De Visser, J, Zeyl, C.W, Gerrish, P.J, Blanchard, J.L Lenski R.E.** Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science.* 283, 404–406. **(1999)**
- De Visser, J.A.G.M., & Rozen D.E.** Clonal interference and the periodic selection of new beneficial mutations in *Escherichia coli*. *Genetics.* 172, 2093–2100. **(2006)**
- De Visser, J.A.G.M., Cooper, T. F. Elena, S. F.** The causes of epistasis. *Phil. Trans. R. Soc.* 278, 3617–3624. **(2011)**
- Desai, M.M. & Fisher D. S.** Beneficial mutation-selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics.* 176, 1759–1798. **(2007)**
- Dillon, N.** Heterochromatin structure and function. *Biol. Cell.* 96:631–637. **(2004)**
- Di Pietro, A, Garcia-Maceira, F.I, Meglecz, E, Roncero, M.I.** A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol.* 39, 1140-1152. **(2001)**
- Di Pietro, A, Roncero, M.I.G, Roldán M.C.R.** From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection. In *Plant Relationships*, pp 181-200. Springer. **(2009)**
- Do, A.T, Brooks, J.T, Le Neveu, M.K, LaRocque, J.R.** Double-strand break repair assays determine pathway choice and structure of gene conversion events in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)*, 4:425–432. **(2014)**
- Ferreira, R.B, Monteiro, S, Freitas, R, Santos, C.N, Chen, Z, Batista, L.M, Duarte, J, Borges, A, Teixeira, A.R.** Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 505–524. **(2006)**
- Feschotte, C & Pritham, E.J.** DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*, 41(1), 331–368. **(2007)**

- Fogle, C.A, Nagle J. L, Desai M.M.** Clonal interference, multiple mutations and adaptation in large asexual populations. *Genetics* 180: 2163–2173 **(2008)**
- Garland, T & Rose, M.R.** (eds) *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*, Univ. of California Press, **(2009)**
- Garrison, E & Marth, G.** Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv preprint.arXiv:1207. Available: <http://arxiv.org/abs/1207.3907>. **(2012)**
- Gäumann, E.** Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*,47, 342–357. **(1957)**
- Gäumann, E.** The mechanism of fusaric acid injury. *Phytopathology*, 48, 670– 686. **(1958)**
- Gerrish, P, & Lenski, R** The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetics* 102/103: 127–144. **(1998)**
- Gresham, D, Desai, M.M, Tucker, C.M, Jenq, H.T. Pai D.A Ward, A, DeSevo, C.G, Botstein, D, Dunham, M.J.** The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. *PLoS Genet.* 4: e1000303. **(2008)**
- Gilbert, N, Lutz-Prigge, S, Moran, J.V.** Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 110(3), 315- 325. **(2002)**
- Goodwin, T.J, Butler, M.I, Poulter, R.T.** Cryptons: a group of tyrosinerecombinase- encoding DNA transposons from pathogenic fungi. *Microbiology*, 149(Pt 11):3099–3109. **(2003)**
- Gomez-Gomez, E, Anaya, N, Roncero, M.I.G, Hera, C.** Folyt1, A New member of the hAT family, is active in the genome of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, 27(1):67–76. **(1999)**
- Halligan, D.L. & Keightley, P.D.** Spontaneous mutation accumulation studies in evolutionary genetics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 151–172 **(2009)**
- Hartl, D.L. & Clark, A.G.** *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., **(2007)**
- Hastings, P. J, Lupski, J. R, Rosenberg, S. M, Ira, G.** Mechanisms of change in gene copy number. *Nat. Rev. Genet.* 10, 551–564. **(2009)**

- Hennequin, C, Benailly N, Silly C, Sorin M, Scheinmann P, Lenoir G, Gaillard, J.L, Berche, P.** In Vitro Susceptibilities to Amphotericin B, Itraconazole, and Miconazole of Filamentous Fungi Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob. Agents. Ch.* 41,2064–2066. (1997)
- Hernández-Chávez, M.J, Pérez-García, L.A, Niño-Vega, G.A, Mora-Montes, H.M.** Fungal strategies to evade the host immune recognition. *J Fungi.* 23,3(4). (2017).
- Hong-Sheng, W, Wei, B, Dong-Yang, L, Ning, L, Rong-Rong, Y, Waseem, R, Shen, Q.R.** Effect of fusaric acid on biomass and photosynthesis of watermelon seedlings leaves. *Caryologia,* 61, 258–268. (2008)
- Hua-Van, A, Daviere, J.M, Kaper, F, Langin, T, Daboussi, M.J.** Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Curr Genet,* 37(5):339–347. (2000)
- Hue, F, Huerre, M, Rouffault, M, De Bievre, C.** Specific Detection of *Fusarium* Species in Blood and Tissues by a PCR Technique. *J. Clin. Microbiol.;* 37:2434- 2438. (1999)
- Hull, R.M, Cruz, C., Jack, C.V, Houseley, J., Noronha, M, Calderon, L.** Environmental change drives accelerated adaptation through stimulated copy number variation. *PLoS Biol.* 15:e2001333. doi:10.1371/journal.pbio.2001333 (2017).
- Ivanov, E.L, Sugawara, N, Fishman-Lobell, J, Haber, J.E.** Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 142:693–704. (1996)
- Jacobson, D.J & Gordon, T.R.** variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Mycol Res* 94:734-744. (1990)
- Jiang, J, Liu, X, Yin, Y, Ma, Z.** Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One,* 6, e28291. (2011)
- Jiao, J., Zhou, B., Zhu, X., Gao, Z, Liang, Y.** Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells. *Planta,*238, 727–737. (2013)
- Jones, J.D.G & Dangl, J.L.** The plant immune system. *Nature* 444: 323-329 (2006)

- Jordan, E, Saedler, H, Starlinger, P.** O^0 and strong-polar mutations in the gal operon are insertions. *Mol. Gen. Genet.*, 102(4), 353-363. (1968)
- Joseph, S.B & Hall, D.W.** Spontaneous mutations in diploid *Saccharomyces cerevisiae*: more beneficial than expected. *Genetics* 168: 1817–1825. (2004)
- Kalendar, R, Tanskanen, J, Immonen, S, Nevo, E, Schulman, A.H.** Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(12), 6603-6607. (2000)
- Kao, K.C & Sherlock, G.** Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* 40: 1499–1504. (2008)
- Kawecki, T.J, Lenski, R.E, Ebert, D, Hollis, B, Olivieri, I, Whitlock, M.C.** Experimental evolution. *Trends Ecol. Evol.* 27, 547–560. (2012)
- Kazazian, H.H, Jr.; Wong, C, Youssoufian, H, Scott, A.F, Phillips, D.G, Antonarakis, S.E.** Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature.* 332(6160), 164-166. (1988)
- Kazazian, H.H,Jr.** Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, 303 (5664), 1626-1632. (2004)
- Keightley, P, Trivedi, U, Thomson, M, Oliver, F, Kumarand, S, Blaxter, M.L.** Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines. *Genome Res.* 19, 1195–1201 (2009).
- Keigo, I, Chizu, Y.A, Yasuaki, M, Mutsuko, Y, Tohru, T, Tsutomu, A.** A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by Transposon Insertion. *Plos One.* 7(8),
- Inami, K, Yoshioka-Akiyama, C, Morita, Y, Yamasaki,M, Tohr.** A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by transposon insertion.PlosOne. 7(8): e44101. (2012)
- Kidwell, M.G & Lisch, D.R.** Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution.* 55(1), 1- 24. (2001)

- Kojima, K & Jurka, J.** Crypton transposons: identification of new diverse families and ancient domestication events. *Mob DNA*. 2(1):12. (2011)
- Koo, B. M, Kritikos, G, Farelli, J,D, Todor, H' Tong, K, Kimsey, H, Wapinski, I, Galardini, M, Cabal, A, Peters, J.M, Hachmann, A.B, Rudner, D.Z, Allen, K.N, Typas, A, Gross, C.A.** Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst*. 4, 291–305 (2017).
- Lakshminarayanan, K. & Subramanian, D.** Is fusaric acid a vivotoxin? *Nature*, 176, 697–698. (1955)
- Laskowski-Peak, M.C, Calvo, A.M, Rohrsen, J, Smulian, A.G.** VEA1 is required for cleistothecial formation and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 838–846. (2012)
- Lanciano, S & Mirouze, M.** Transposable elements: all mobile, all different, some stress responsive, some adaptive? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 49:106–114 (2018)
- Lander, E. S, Linton, L. M, Birren, B, Nusbaum, C, Zody, M. C, Baldwin, J, Devon, K, Dewar, K, Doyle, M, FitzHugh, W, Funke, R, Gage, D, Harris, K, Heaford, A, Howland, J, Kann, L, Lehoczky, J, LeVine, R, McEwan, P, McKernan, K, Meldrim, J, Mesirov, J. P, Miranda, C, Morris, W, Naylor, J, Raymond, C, Rosetti, M, Santos, *et al* & Chen, Y. J.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822), 860-921. (2001)
- Lang, G, Botstein, D, Desai, M.M.** Genetic Variation and the Fate of Beneficial Mutations in Asexual Populations. *Genetics*. 188, 647–661. (2011)
- Lang, G, Rice, D.P, Hickman, M.P, Sodergren, E, Weinstock, G.M, Botstein, D, Desai, M.M.** Pervasive genetic hitchhiking and clonal interference in forty evolving yeast populations. *Nature*. 500, 571-574. (2013)
- Lee, J, Myong, K, Kim, J.E, Kim, H.K, Yun, S.H, Lee, Y.W.** FgVelB globally regulates sexual reproduction, mycotoxin production and pathogenicity in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 158, 1723–1733. (2012)
- Lerman, D.N & Feder, M.E.** Naturally occurring transposable elements disrupt hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 22(3), 776-783. (2005)
- Leslie, J & Summerell, B.** *The Fusarium Laboratory Manual*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, (2006)

- Lieber, M.R.** The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 79:181–211. **(2010)**
- Li, H & Durbin, R.** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25, 1754–1760. **(2009)**
- Li, H, Handsaker, B, Wysoker, A, Fennell, T, Ruan, J, Homer, N, Marth, G, Abecasis, G, Durbin, R.** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 25, 2078–2079. **(2009)**
- Lin, F.L, Sperle, K, Sternberg N.** Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol.* 4,1020–1034. **(1984)**
- Locke, D.P, Segreaves, R, Carbone, L, Archidiacono, N, Albertson, D. G, Pinkel, D, Eichler, E.E.** Large-scale variation among human and great ape genomes determined by array comparative genomic hybridization. *Genome Res.* 13(3), 347-357. **(2003)**
- Loewe, L. & Hill, W.G.** The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Phil. Trans. R. Soc.* 365, 1153–1167. **(2010)**
- Lopez-Berges, M.S, Hera, C, Sulyok, M, Schafer, K, Capilla, J, Guarro, J, Di Pietro, A.** The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* 87, 49–65. **(2013)**
- Loman, N.J, Quick, J, Simpson, J.T.** A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Meth.* 12(8):733–5. **(2015)**
- Lu, H, Giordano, F, Ning, Z.** Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics proteomics bioinformatics* 14(5):265–79. **(2016)**
- Lynch, M, & Conery, J. S.** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 290,1151–1155. **(2000)**
- Ma, J, Devos, K.M, Bennetzen, J, L.** Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res*;14(5):860–869. **(2004)**
- Ma, L.J, Van Der Does, H.C, Borkovich, K.A, Coleman, J.J, Daboussi, M.J, Di Pietro, A, Dufresne, M, Freitag, M, Grabherr, M, Henrissat, B, et al & Rep,**

- M.** Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464: 367-373. (2010)
- Malini, S.** Heavy metal chelates of fusaric acid: in vitro spectrophotometry. *J. Phytopathol.* 57, 221–231. (1966)
- Margulies, M, Egholm, M, Altman, W.E, Attiya, S, Bader, J.S, Bembem, L.A, et al & Rothberg, J.M.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 437(7057):376–80. (2005)
- Marre`, M.T., Vergani, P, Albergoni, F.G.** Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42,141–157. (1993)
- McKenna, A, Hanna, M, Banks, E, Sivachenko, A, Cibulskis, K, Kernytsky, A, Garimella, K, Altshuler, D, Gabriel, S, Daly, M, DePristo, M.A.** The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20: 1297–303. (2010)
- Mehrabi, R, Bahkali, A.H, Abd-Elsalam, K.A, Moslem, M, Ben M'Barek, S, Gohari, A.M, Jashni, M.K, Stergiopoulos, I, Kema, G.H.J, de Wit, P.J.G.M.** Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. *FEMS Microbiol Rev.* 35(3):542–554. (2011)
- Merhej, J, Urban, M, Dufresne, M, Hammond-Kosack, K.E, Richard-Forget, F, Barreau, C.** The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 363–374. (2012)
- Meyer, J.R, Dobias, D.T, Weitz, J.S, Barrick, J.E, Quick, R.T, Lenski, R.E.** Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science.* 335, 428–432. (2012)
- Miller, C.R, Joyce, P & Wichman, H.A.** Mutational effects and population dynamics during viral adaptation challenge current models. *Genetics.* 187: 185–202. (2011)
- Miralles, R, Gerrish, P.J, Moya, Elena, S.F.** Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science.* 285: 1745–1747. (1999)
- Moran, J.V, DeBerardinis, R.J, Kazazian, H.H.Jr.** Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science.* 283(5407), 1530-1534. (1999)

- Murray, M.G &Thompson, W.F.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325 (1980)
- Myung, K, Li, S, Butchko, R.A, Busman, M, Proctor, R.H, Abbas, H.K, Calvo, A.M.** FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5089–5094. (2009)
- Navarro-Velasco, G.Y, Prados-Rosales, R.C, Ortiz-Urquiza, A, Quesada-Moraga, E, Di Pietro, A.** *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol.* 48(12),1124-9 (2011)
- Nei, M.** Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2318–2342 (2005).
- Niehaus, E.M, von Barga, K.W, Espino, J.J, Pfannmuller, A, Humpf, H.U, Tudzynski, B.** Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*98, 1749–1762. (2014)
- Nucci, M. & Anaissie, E.** *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.*20, 695–704. (2007)
- O´Donnell, K, Kistler, H.C, Cigelnik, E, Ploetz, R.C.** Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 95, 2044- 2049. (1998)
- Orel N, Kyryk, A, Puchta, H.** Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* 35:604–612. (2003)
- Olivain, C, Alabouvette, C.** 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. (1999)
- Ortoneda, M, Guarro, J, Madrid, M.P, Caracuel, Z, Roncero, M.I.G, Mayayo, E, Di Pietro A.** *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity.* 72, 1760-1766. (2004)
- Ossowski, S, Schneeberger, K, Lucas-Lledó, J.I, Warthmann, N, Clark, R.M, Shaw, R.G, Weigel, D, Lynch M.** The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 327, 92–94 (2010).

- Pache, R.A., Madan, M.M, Aloy, P.** Exploiting gene deletion fitness effects in yeast to understand the modular architecture of protein complexes under different growth conditions. *BMC Syst. Biol.* 3, 74 (2009).
- Pan, J.H, Lin, Y.C, Tan, N, Gu, Y.C.** Cu(II): a “signaling molecule” of the mangrove endophyte *Fusarium oxysporum* ZZF51? *Biometals*, 23, 1053–1060. (2010)
- Paquin, C & Adams, J.** Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature*.302, 495–500 (1983).
- Pareja Jaime, Y, Martín Urdiróz, M, Roncero, M.I.G, Gonzalez Reyes, J.A, Roldan, M.C.** Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Molecular plant pathology*. 11, 479-493. (2010)
- Pavlovkin, J.** Effect of fusaric acid on the electrical properties of maize root hairs plasmalemma. *Agriculture*. 44, 350–355. (1998)
- Prak, E.T & Kazazian, H.H.Jr.** Mobile elements and the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 1(2), 134-144. (2000)
- Park, Y.S, Lian, H, Chang, M, Kang, C.M, Yun, C.W.** Identification of high-affinity copper transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 73, 29–38. (2014)
- Pray, L.** Transposons: The jumping genes. *Nature Ed.* 1(1):204. (2008)
- Perez-Nadales, E & Di Pietro, A.** The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 23, 1171-1185. (2011)
- Perfeito, L, Fernandes, L, Mota, C, Gordo, I.** Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects. *Science*. 317, 813–815 (2007).
- Petrov, D.A & Hartl, D.L.** Trash DNA is what gets thrown away: high rate of DNA loss in *Drosophila*. *Gene*, 205(1-2), 279- 289. (1997)
- Peters, A.D & Otto, S.P.** Liberating genetic variance through sex. *BioEssays*. 25:533–537. (2003)
- Pitel, D.W. & Vining, L.C.** Accumulation of dehydrofusaric acid and its conversion to fusaric and 10-hydroxyfusaric acids in cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Can. J. Biochem.* 48, 623–630. (1970)

- Philippe, N, Crozat, E., Lenski, R.E. & Schneider, D.** Evolution of global regulatory networks during a long-term experiment with *Escherichia coli*. *BioEssays*. 29, 846–860. (2007)
- Pontier, D.B & Tijsterman, M.** A robust network of double-strand break repair pathways governs genome integrity during *C. elegans* development. *Curr Biol*. 19:1384–1388. (2009)
- Porter, J.K, Bacon, C.W, Wray, E.M, Hagler, W.M. Jr.** Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Nat. Toxins*, 3, 91–100. (1995)
- Quinlan, A.R & Hall, I.M.** BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 26, 841–842. (2010)
- Bhargava, R, Onyango, D.O, Stark, J.M.** Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet* .32(9), 566–575 (2016)
- Ramos, B, Alves-Santos, F.M, García-Sánchez, M.A, Martín-Rodrigues, N, Eslava, A.P, Díaz-Mínguez, J.M.** The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet Biol*. 44(9),864–876. (2007)
- Reams, A. B & Roth, J. R.** Mechanisms of gene duplication and amplification. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 7: a016592. doi: 10.1101/ cshperspect. a016592. (2015)
- Rep, M & Kistler, H.C.** The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Curr Opin Plant Biol*. 13(4),420–426. (2010)
- Riethman, H.** Human subtelomeric copy number variations. *Cytogenet. GenomeRes*.123,244–252. (2009)
- Roca, M.G, Arlt, J, Jeffree, C.E, Read, N.D.** Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 4(5),911–919. (2005)
- Rodriguez-Galvez, E, Mendgen, K.** The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189, 61-72. (1995)
- Rothberg, J & Myers, J.** Semiconductor sequencing for life. *J Biomol Tech.*; 22(Suppl), S41–S2. (2011)

- Rouzine, I, Brunet, E, Wilke, C.** The traveling-wave approach to asexual evolution: Muller's ratchet and the speed of adaptation. *Theor. Popul. Biol.* 73, 24–46. (2008)
- Rouxel, T, Grandaubert, J, Hane, J.K, Hoede, C, van de Wouw, A.P, Couloux, A, Dominguez, V, Anthouard, V, Bally, P, Bourras, S, et al & Howlett, B.J.** Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nat Commun*, 2,202. (2011)
- Rhoads, A & Au, K.F.** PacBio Sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13(5),278–89. (2015)
- Rubin, G.M, Kidwell, M.G, Bingham, P.M.** The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations. *Cell* 29(3), 987-994. (1982)
- Ruiz, J.A, Bernar, E.M, Jung, K.** Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS One*,10, e0117040. (2015)
- Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463–7. (1977)
- Saksouk, N, Simboeck, E, Déjardin, J.** Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8:3. 2015.
- SanMiguel, P, Tikhonov, A, Jin, Y.K, Motchoulskaia, N, Zakharov, D, Melake-Berhan, A, Springer, P.S, Edwards, K.J, Lee, M, Avramova, Z, Bennetzen, J.L.** Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*. 274(5288), 765-768. (1996)
- SanMiguel, P, Gaut, B.S, Tikhonov, A, Nakajima, Y, Bennetzen, J.L.** The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat. Genet* 20(1), 43-45. (1998)
- Samadi, L. & Shahsavan Behboodi, B.** Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. *Planta*. 225, 223–234. (2006)
- Soria, P.S, McGary, K.L, Rokas, A.** Functional divergence for every paralog. *Mol.Biol.Evol.* 31,984–992. (2014).
- Snyder, W.E & Hansen, H.N.** The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27: 64-67. (1940)

- Spanu, P.D, Abbott, J.C, Amselem, J, Burgis, T.A, Soanes, D.M, Stuber, K, Loren van Themaat, E.V, Brown, J.K.M, Butcher, S.A, Gurr, S.J, et al & Panstruga R.** Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*. 330(6010):1543–1546. **(2010)**
- Schadt, E.E, Turner, S, Kasarskis. A.** A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Gen.* 19(R2), R227–R40. **(2010)**
- Schrettl, M. & Haas, H.** Iron homeostasis–Achilles’ heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 400–405. **(2011)**
- Schmidt, S.M, Houterman, P.M, Schreiver, I, Ma, L, Amyotte, S, Chellappan, B, Boeren, S, Takken, F.L.W, Rep, M.** MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *Genomics*, 14:119. **(2013)**
- Steenackers, H.P, Parijs, I, Foster, K.R, Vanderleyden, J.** Experimental evolution in biofilm populations. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 373–397 **(2016)**.
- Stipanovic, R.D, Puckhaber, L.S, Liu, J, Bell, A.** A Phytotoxicity off Fusaric acid and analogous to cotton. *Toxicon.* 57, 176–178. **(2011)**
- Saupe, S.J & Glass, N.L.** Allelic specificity at the het-c heterokaryon incompatibility locus of *Neurospora crassa* is determined by a highly variable domain. *Genetics*, 146(4):1299–1309. **(1997)**
- Sayah, D.M, Sokolskaja, E, Berthoux, L, Luban, J.** Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430(6999), 569-573. **(2004)**
- Saxer, G, Doebeli, M, Travisano, M.** There peat ability of adaptive radiation during long-term experimental evolution of *Escherichia coli* in a multiple nutrient environment. *PLoS ONE* 5, e14184**(2010)**.
- Sheen, F.M & Levis, R.W.** Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*91(26), 12510-12514. **(1994)**
- Shetty, N.P, Mehrabi, R, Lütken, H, Haldrup, A, Kema, G.H.J, Collinge, D.B, Jørgensen, H.J.L.** Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol.* 174:637–647 **(2007)**.

- Startek, M, Szafranski, P, Gambin, T, Campbell, I.M, Hixson, P, Shaw, C.A, Stankiewicz, P, Gambin, A.** Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 43:2188–2198. (2015)
- Stein, L.D, Bao, Z, Blasiar, D, Blumenthal, T, Brent, M.R, Chen, N, Chinwalla, A, Clarke, L, Clee, C, Coghlan, A, Coulson, A, D'Eustachio, P, Fitch, D.H, Fulton, L.A, Fulton, R.E, Griffiths-Jones, S, Harris, T.W, Hillier, L.W, et al & Waterston, R.H.** The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS. Biol.*1(2), E45. (2003)
- Symer, D.E, Connelly, C, Szak, S.T, Caputo, E.M, Cost, G.J, Parmigiani, G, Boeke, J.D.** Human l1 retrotransposition is associated with genetic instability *in vivo*. *Cell.* 110 (3), 327- 338. (2001)
- Tamari, K. & Kaji, J.** Studies on the mechanism of injurious action of fusaric acid on plant-growth. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 26, 345–349. (1952)
- Takeshi, K, Tatsuya, S, Akira, S, Kotaro, A, Tohru, T, Ken, K, Tsutomu, A.** A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1. *FEMS Microbiology Letters.* 363 (14), 1-6 (2016)
- Tenaillon, O, Rodríguez-Verdugo, A, Gaut, R.L, McDonald, P, Bennett, A.F, Long, A.D, Gaut, B.S.** The molecular diversity of adaptive convergence. *Science* 335, 457–461 (2012).
- Teunissen, H, Verkooijen, J, Cornelissen, B, Haring, M.** Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics.* 268: 298-310 (2002)
- Teunissen, H.A.S, Rep, M, Houterman, P.M, Cornelissen, B.J.C, Haring, M.A.** Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on Foxy & AFLPs. *Mol Genet Genomics.* 269(2),215–226. (2003)
- Trojer, P & Reinberg, D.** Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?. *Mol. Cell* 28:1–13. (2007)
- Vartivarian, S.E, Anaissie, E.J, Bodey, G.P.** Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clinical infectious diseases* 17, 487-491. (1993)

- Vicentefranqueira, R, Moreno, M.A, Leal, F, Calera, J.A.** The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot Cell*, 4, 837–848. (2005)
- Vincent, A.T, Derome, N, Boyle, B, Culley, A.I, Charette, S.J.** Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*. 138, 60–71. (2017)
- Viswanathan, A, Ghazoul, J, Honwad, G, Kumar, N.A, Bagchi R.** The effects of rainforest fragment area on the strength of plant-pathogen interactions. *Biol Lett. Jan.* 31,15(1): 20180493 (2019)
- Wagner, A.** The Origins of Evolutionary. *Innovations Oxford Univ. Press.* (2011).
- Walbot, V.** Maize genome in motion. *Genome Biol*, 9(4):303 (2008)
- Waterston, R.H.; Lindblad-Toh, K.; Birney, E.; Rogers, J.; Abril, J.F.; Agarwal, P.; Agarwala, R.; Ainscough, R.; Alexandersson, M.; An, P.; Antonarakis, S.E.; Attwood, J.; Baertsch, R.; Bailey, J.; Barlow, K.; Beck, S.; Berry, E.; Birren, B.; Bloom, T.; Bork, P.; Botcherby, M.; Bray, N.; Brent, M. R.; Brown, D. G., K. D.; Deri, J.; & Lander, E. S.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420(6915), 520-562. (2002)
- Webster, R.H. & Sil, A.** Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 14 573–14 578. (2008)
- Wessler, S.R.** Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci.* 103(47),17600–17601. (2006)
- Weckselblatt, B, Rudd, M.K.** Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends Genet.* 31:587–599. (2015)
- Wiebe, M.** Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology*. 58, 421-427. (2002)
- Wiemann, P, Brown, D.W, Kleigrewe, K, Bok, J.W, Keller, N.P, Humpf, H.U, Tudzynski, B.** FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Microbiol.* 77, 972–994. (2010)

- Winzler, E.A, Shoemaker D.D, Astromoff, A, Liang, H, Anderson, K, Andre, B, Bangham, R, Benito, R, Boeke, J.D, Bussey, H, Chu, A.M, Connelly, C, Davis, K, Dietrich, F, Dow, S.W, El Bakkoury, M, Foury, F, Friend, S.H, Gentalen, E, Giaever, G, Hegemann, J.H, Jones, T, Laub, M, Liao, H, *et al* & Davis, R.W. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285, 901–906 (1999).
- Wilke, C.O. The speed of adaptation in large asexual populations. *Genetics*. 167, 2045–2053. (2004)
- Wicker, T, Sabot, F, Hua-Van, A, Bennetzen, J.L, Capy, P, Chalhoub, B, Flavell, A, Leroy, P, Morgante, M, Panaud, O, *et al*. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*. 8(12), 973–982. (2007)
- Woods, R, Schneider, D, Winkworth, C.L, Riley, M.A, Lenski, R.E. Tests of parallel molecular evolutionary long-term experiment with *Escherichia coli*. *Proc.Natl Acad. Sci.USA*. 103, 9107–9112(2006).
- Yabuta, T, Kambe, K, Hayashi, T. Biochemistry of the bakanae fungus.I. Fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn*.10, 1059–1068. (1937)
- Yabuta, T, Sumiki, Y, Aso, K, Tamura, T, Igarashi, H, Tamari, K. Biochemical studies on the bakanae fungus. IV. The culture conditions for producing gibberellin or fusaric acid. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn*. 15, 1209–1220. (1939)
- Yang, Z & Rannala, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature* 430(13), 303-314. (2012)
- Yang, L, Jelsbak, L, Marvig, R.L, Damkiær, S, Workman, C.T, Rau, M.H, Hansen, S.K, Folkesson, A, Johansen, H.K, Ciofu, O, Højby, N, Sommer, M.O, Molin, S. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 7481–748.6 (2011)
- Yin, E.S, Rakhmankulova, M, Kucera, K, de Sena Filho, J.G, Portero, C.E, Narvaez-Trujillo, A, Holley, S.A, Strobel, S.A. Fusaric acid induces a notochord malformation in zebrafish via copper chelation. *Biometals*. 28, 783–789. (2015)
- Zhang, W, Edwards, A, Fan, W, Deininger, P, Zhang K. Alu distribution and mutation types of cancer genes. *BMC Genomics*. 12:157. (2011)

Publicaciones

Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts

CRISTINA LÓPEZ-DÍAZ^{1,†}, VAHID RAHJOO^{1,‡,†}, MICHAEL SULYOK², VERONICA GHIONNA^{1,§}, ADELA MARTÍN-VICENTE³, JAVIER CAPILLA³, ANTONIO DI PIETRO^{1,*} AND MANUEL S. LÓPEZ-BERGES^{1,* * ,¶}

¹Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Agroalimentario (ceiA3), Córdoba, E-14071, Spain

²Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Konrad Lorenz Str. 20, Tulln, 3430, Austria

³Mycology Unit, Medical School, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, 43204, Spain

SUMMARY

Fusaric acid (FA) is amongst the oldest identified secondary metabolites produced by *Fusarium* species, known for a long time to display strong phytotoxicity and moderate toxicity to animal cells; however, the cellular targets of FA and its function in fungal pathogenicity remain unknown. Here, we investigated the role of FA in *Fusarium oxysporum*, a soil-borne cross-kingdom pathogen that causes vascular wilt on more than 100 plant species and opportunistic infections in humans. Targeted deletion of *fub1*, encoding a predicted orthologue of the polyketide synthase involved in FA biosynthesis in *F. verticillioides* and *F. fujikuroi*, abolished the production of FA and its derivatives in *F. oxysporum*. We further showed that the expression of *fub1* was positively controlled by the master regulator of secondary metabolism LaeA and the alkaline pH regulator PacC through the modulation of chromatin accessibility at the *fub1* locus. FA exhibited strong phytotoxicity on tomato plants, which was rescued by the exogenous supply of copper, iron or zinc, suggesting a possible function of FA as a chelating agent of these metal ions. Importantly, the severity of vascular wilt symptoms on tomato plants and the mortality of immunosuppressed mice were significantly reduced in *fub1Δ* mutants and fully restored in the complemented strains. Collectively, these results provide new insights into the regulation and mode of action of FA, as well as on the function of this phytotoxin during the infection process of *F. oxysporum*.

Keywords: fungal pathogenicity, fusaric acid, *Fusarium oxysporum*, metal chelation, mycotoxins, phytotoxicity, virulence.

INTRODUCTION

Fungi cause major plant diseases and destroy or contaminate each year a significant proportion of global agricultural production, making them by far the most damaging class of plant pathogen (Fisher *et al.*, 2012; Strange and Scott, 2005). Moreover, opportunistic fungal pathogens of humans can provoke life-threatening systemic infections, particularly in immunocompromised patients (Fridkin, 2005). The soil-inhabiting fungus *Fusarium oxysporum* has been ranked amongst the top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology based on scientific/economic importance, and causes vascular wilt disease in more than 100 different crops (Armstrong and Armstrong, 1981; Dean *et al.*, 2012). In addition, *F. oxysporum* isolates can cause opportunistic infections in humans, ranging from superficial or locally invasive to disseminated, depending on the immune status of the host (Nucci and Anaissie, 2007). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* FGSC 9935 (FOL 4287) is a fully sequenced isolate (Ma *et al.*, 2010) able to kill both tomato plants and immunosuppressed mice (Ortoneda *et al.*, 2004). Therefore, this isolate represents an excellent model for the study of the genetic basis of cross-kingdom pathogenicity in fungi.

Many fungi produce secondary metabolites that are toxic to plants or animals (Berthiller *et al.*, 2013). Fusaric acid (FA), a picolinic acid derivative originally isolated from *Fusarium heterosporium* (Yabuta *et al.*, 1937), was the first fungal phytotoxin isolated from infected host plants (Gäumann, 1957) and is known for its high phytotoxicity (Niehaus *et al.*, 2014; Stipanovic *et al.*, 2011). FA also exhibits toxicity towards animals, including notochord malformation in zebrafish (Yin *et al.*, 2015), and neurotoxicity in mammals (Porter *et al.*, 1995), and towards bacteria (Bacon *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2015). Although several studies on the mode of action of FA have been conducted, the cellular basis of its toxicity remains poorly understood. Suggested mechanisms include the modification of cell membrane potential, inhibition of ATP synthesis, chelation of metal ions or electrolyte leakage (D'Alton and Etherton, 1984; Marrè *et al.*, 1993; Pavlovkin, 1998; Ruiz *et al.*, 2015). Recently, chromatin condensation, cytochrome *c* release, DNA fragmentation and hydrogen peroxide accumulation have

Correspondence: Email: *ge2dipia@uco.es; **ge2snlpm@uco.es

†These authors contributed equally to this work.

Present addresses: ‡Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj 31585, Iran. §Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari 70126, Italy. ¶Division of Molecular Biology, Bio-center, Innsbruck Medical University, Innsbruck A-6020, Austria.

been reported in FA-treated plant cell cultures, suggesting a possible involvement of programmed cell death in FA toxicity (Jiao *et al.*, 2013; Samadi and Shahsavan Behboodi, 2006).

The polyketide synthase (PKS) Fub1 has been identified recently as the first enzyme of the FA biosynthetic pathway in *Fusarium verticillioides* (Brown *et al.*, 2012). The *fub1* gene is part of the FA gene cluster, and its inactivation is sufficient to completely block FA production (Brown *et al.*, 2012; Niehaus *et al.*, 2014). In the present work, we studied the role of Fub1 in *F. oxysporum*. We found that *fub1* was essential for the production of FA and its derivatives in this fungus, and that its transcription was positively regulated by LaeA, a master regulator of secondary metabolism, and the alkaline pH regulator PacC. We further demonstrated that the loss of Fub1 and FA in *F. oxysporum* led to reduced virulence in tomato plants and immunodepressed mice. Finally, we showed that phytotoxicity of FA could be reduced by supplying copper, iron or zinc to the plants. Our results establish a functional role for FA in fungal virulence on plants and mammals.

RESULTS

Inactivation of the PKS Fub1 abolishes FA production in *F. oxysporum*

A BLASTP search in the *Fusarium* Comparative Database (Broad Institute), using Fub1 from *Fusarium fujikuroi* (FFUJ_02105) as a bait, identified a single predicted Fub1 orthologue (FOXG_15248) displaying 89% overall identity with the query protein. Manual inspection of the *F. oxysporum* *fub1* locus identified all other members of the FA gene cluster previously described in *F. verticillioides* (Brown *et al.*, 2012) and *F. fujikuroi* (Niehaus *et al.*, 2014) (Fig. S1A, see Supporting Information). Interestingly, two additional putative genes were present between *fub3* and *fub4* in different *F. oxysporum* isolates, including the reference strain FOL 4287 (Fig. S1A) (Brown *et al.*, 2015). Both genes are neighbours in other *Fusarium* species, but not located in the FA gene cluster. For example, in *F. fujikuroi*, the orthologues of these two genes, FFUJ_11046 and FFUJ_11047, are located on chromosome 10, whereas the FA gene cluster is located on chromosome 3 (Fig. S1A). It is currently unknown whether the insertion of these two additional genes has any effect on the FA gene cluster.

Recently, additional components of the cluster, including two Zn(II)₂Cys₆ transcription factors, have been identified in different *Fusarium* species (Brown *et al.*, 2015; Studt *et al.*, 2016). To study the role of Fub1 in FA production by *F. oxysporum*, we replaced the entire FOXG_15248 coding sequence with the hygromycin B resistance gene (*hph*'), generating several *fub1*Δ strains (Fig. S1B and S1C). To determine whether FOXG_15248 was responsible for FA production in *F. oxysporum*, extracts from cultures of the different strains grown on potato dextrose agar (PDA) or Czapek-Dox agar (CDA) were analysed by high-performance liquid

chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC/ESI-MS/MS). This approach allows the reliable and sensitive quantification of several hundred fungal analytes, including almost all mycotoxins for which standards are commercially available (Malachova *et al.*, 2014). FA and its derivative fusarinolic acid (FnA) were detected in wild-type extracts, but not in those of the *fub1*Δ mutant (Fig. 1A). Interestingly, the total amount of mycotoxin (FA + FnA) was approximately 2.5 times higher in CDA than in PDA cultures, with an FA : FnA ratio of 29.5 : 1 in the former and 1 : 2.75 in the latter (Fig. 1A). These data are consistent with those reported in *F. fujikuroi* (Niehaus *et al.*, 2014). In addition to FA and FnA, beauvericin (Bea) and bikaverin (Bik) were detected in all samples. Interestingly, both compounds were more abundant in the *fub1*Δ cultures compared with the wild-type, especially in CDA (Fig. 1B). Reintroduction of the intact *fub1* allele into *fub1*Δ, yielding the complemented *fub1*Δ^C strain (Fig. S2, see Supporting Information), fully restored the wild-type FA levels (Fig. 1). Thus, Fub1 is responsible for the production of FA and its derivatives in *F. oxysporum*.

Next, we tested the potential toxicity of FA on *F. oxysporum*. When the wild-type strain or *fub1*Δ were cultured on PDA supplemented with 0.25 or 0.5 mg/mL FA, both showed a significant and comparable reduction in radial growth, whereas no growth was detectable at 0.75 mg/mL FA (Fig. S3, see Supporting Information).

Effect of pH and nutrients on *fub1* transcript levels and FA production

In *F. fujikuroi*, *fub1* transcription is positively regulated by the pH response factor PacC at pH 8, but not at pH 4 (Niehaus *et al.*, 2014). We noted that CDA has an initial pH of 6.8 ± 0.2 , whereas PDA has an initial pH of about 5.6 ± 0.2 . Moreover, the pH in CDA, in which NaNO₃ is the sole nitrogen source, tended to increase during fungal growth (data not shown). To discriminate between the effects of medium composition and pH on FA biosynthesis, we germinated conidia of the wild-type strain in potato dextrose broth (PDB) and transferred the germlings to Czapek-Dox liquid (CDL) or fresh PDB buffered to either pH 5 or pH 7 (see Experimental procedures for details). Unexpectedly, in both media, *fub1* transcription and FA production were much higher under moderate acidic conditions, although, as expected, CDL induced more FA (Fig. 2A, B). The effect of pH on FA production was stronger than that of the medium composition, as reflected by the finding that FA production was higher in PDB at pH 5 than in CDL at pH 7 (Fig. 2A, B). Our data indicate that both pH and nutrients are important factors in the regulation of FA biosynthesis, and that this regulation may differ between *F. oxysporum* and *F. fujikuroi*. We next tested the role of PacC in *fub1* regulation using a *pacC* loss-of-function mutant (Caracuel *et al.*, 2003). When germlings of the different strains were grown in glutamine minimal medium

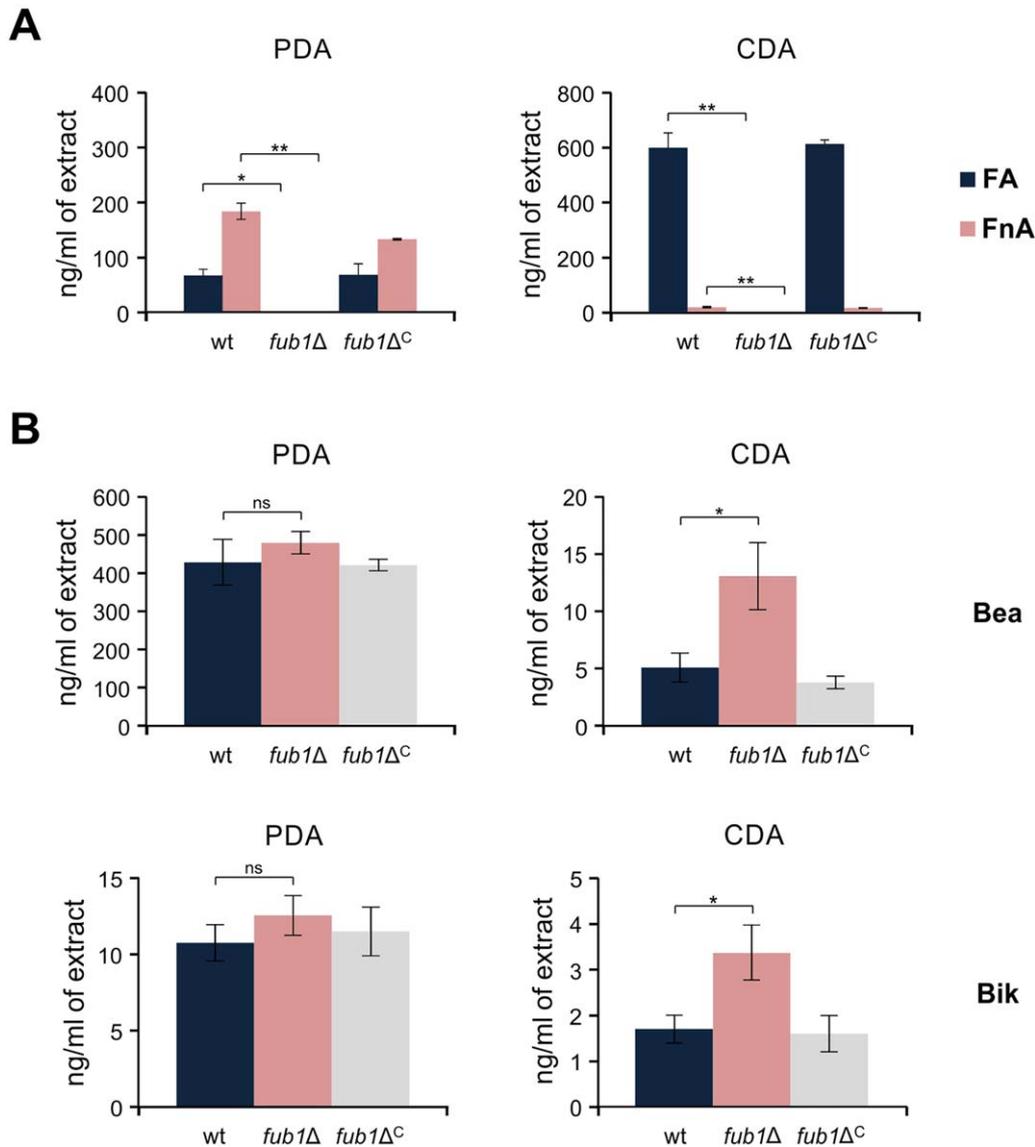


Fig. 1 *Fub1* is required for the production of fusaric acid (FA) and its derivatives in *Fusarium oxysporum*. (A) The amounts of FA and fusarinolic acid (FnA) in cultures of the indicated strains, grown for 3 days on potato dextrose agar (PDA) or Czapek-Dox agar (CDA), were quantified by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and expressed as nanograms per millilitre of extract. (B) The quantification of beauvericin (Bea) and bikaverin (Bik) was performed as in (A). wt, wild-type strain. Bars represent standard errors from two independent fungal cultures. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; ns, not significant.

(GMM) buffered to either pH 5 or pH 7, *fub1* transcript levels were 10 times lower in *pacC*Δ relative to the wild-type at both pH values (Fig. 2C). Thus, PacC functions as a positive regulator of *fub1* within this pH range.

Chromatin structure at the *fub1* locus is controlled by the global regulator of secondary metabolism LaeA and the pH response factor PacC

Although the *fub1*Δ mutants did not show a detectable growth defect on PDA or CDA, we noted that their growth in the

presence of hygromycin B was markedly reduced (Figs 3A and S4, see Supporting Information). Interestingly, the complemented *fub1*Δ^C strains showed a similar growth defect on hygromycin, whereas the transformants carrying an ectopic insertion of the knockout construct (Ect) (Fig. S1C) did not (Figs 3A and S4). We hypothesized that this phenotype could be caused by a chromatin regulatory effect on transcription of the *hph* hygromycin resistance gene inserted at the *fub1* locus. In line with this hypothesis, we found that *hph* transcript levels were between 30 and 50 times higher in Ect than in *fub1*Δ and *fub1*Δ^C (Fig. 3B). LaeA is a global regulator of secondary

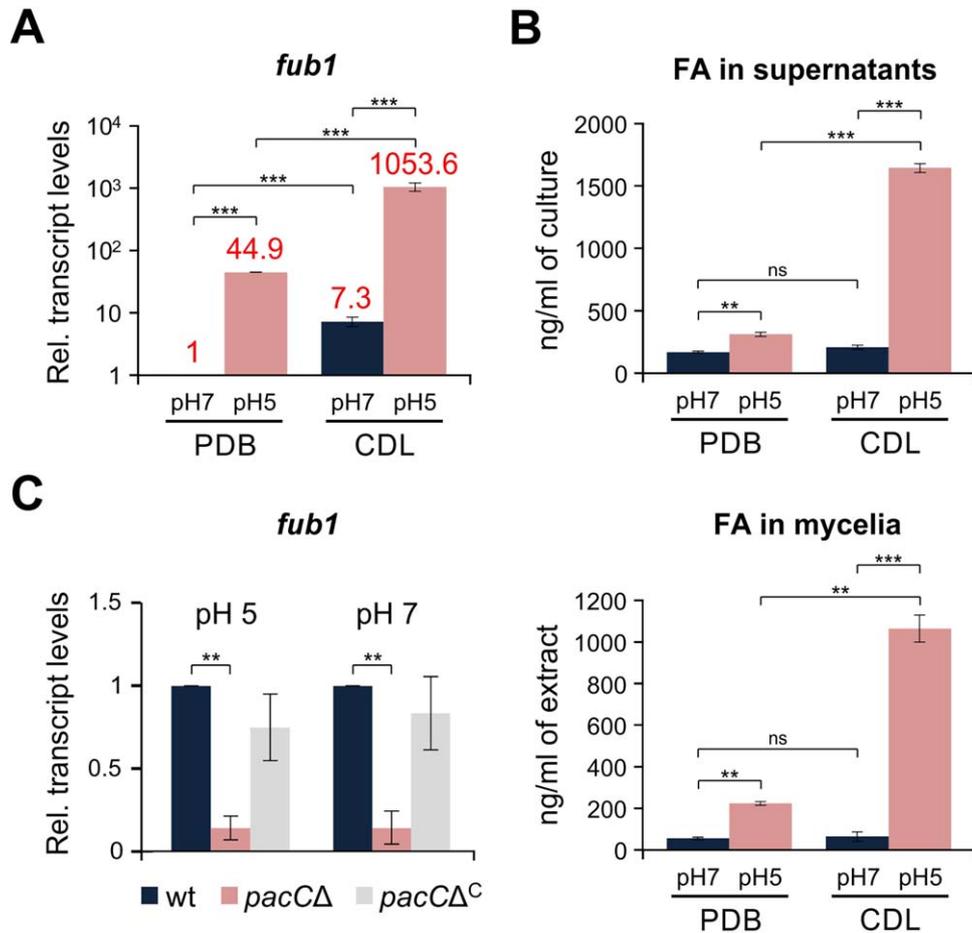


Fig. 2 pH and medium composition regulate *fub1* transcript levels and fusaric acid (FA) production. (A) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the wild-type strain germinated for 16 h in potato dextrose broth (PDB) and then transferred for 3 h to fresh PDB or Czapek-Dox liquid (CDL) buffered at the indicated pH with 100 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES). Transcript levels of *fub1* are expressed relative to those in PDB at pH 7 (see numbers above the columns for exact data). Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. (B) Quantification of FA in culture supernatants (top panel) and mycelia (bottom panel) of the wild-type strain grown as in (A) performed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Bars represent standard errors from two independent fungal cultures. (C) Quantitative real-time RT-PCR was performed in the indicated strains germinated for 16 h in glutamine minimal medium (GMM) and then transferred for 3 h to fresh GMM buffered at the indicated pH with 100 mM MES. Transcript levels of *fub1* are expressed relative to those of the wild-type at both pH values. Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$; ns, not significant; wt, wild-type.

metabolite gene clusters in different fungi (Bok and Keller, 2004; Butchko *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2010), and has been reported previously to regulate FA production in *Fusarium* (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014). Transcript levels of *fub1* in the wild-type and the *laeAΔ^C* strains were between 300 and 500 times higher than in the *laeAΔ* mutant (Fig. 3C). We next examined the role of LaeA in chromatin remodelling and transcriptional regulation at the *F. oxysporum fub1* locus, using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) with promoter- and gene-specific primers (Fig. 4A) on genomic DNA (gDNA) obtained from mycelia treated with micrococcal nuclease (MNase) (Fig. S5, see

Supporting Information). Relative chromatin accessibility, calculated as the ratio of amplification from untreated versus MNase-treated mycelia, was about six times higher in wild-type and *laeAΔ^C* compared with *laeAΔ* (Fig. 4B). Moreover, relative chromatin accessibility was significantly lower at pH 7 in comparison with pH 5, and in a *pacΔ* strain at both pH values compared with the wild-type (Fig. 4C, D), in line with the previous finding that *fub1* transcript levels are lower at pH 7 and in *pacΔ* (Fig. 2A, C). We conclude that chromatin accessibility and transcription at the *fub1* locus, as well as the production of FA and its derivatives, are positively regulated by LaeA, moderate acidic pH and PacC.

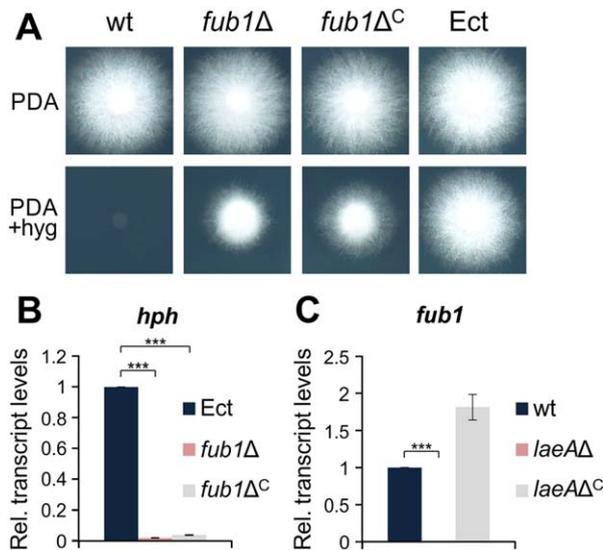


Fig. 3 Transcript levels of *fub1* are controlled by LaeA. (A) Colonies of the indicated strains grown on potato dextrose agar (PDA) with or without 50 mg/mL hygromycin B for 3 days at 28 °C. (B, C) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the indicated strains germinated for 16 h in potato dextrose broth (PDB) and then transferred to fresh PDB for 1 h. Transcript levels of the *hph* (B) and *fub1* (C) genes are expressed relative to those of the ectopic transformant and the wild-type strain, respectively. wt, wild-type strain; Ect, ectopic transformant. Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. *** $P < 0.0001$.

***Fub1* and FA are not required for the growth of *F. oxysporum* under copper-, iron- or zinc-limiting conditions**

The ability of FA to chelate metal ions, such as iron or copper, has been known for a long time (Lakshminarayanan and Subramanian, 1955; Malini, 1966; Pan *et al.*, 2010; Tamari and Kaji, 1952). In a recent study, FA has been shown to chelate different metal ions, including Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} (Ruiz *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015). We thus asked whether the production of FA is required for the growth of *F. oxysporum* under metal-limiting conditions. The depletion of copper, iron or zinc was achieved by the addition of the specific chelators bathocuproinedisulfonic acid disodium salt (BCS), bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt hydrate (BPS) and *N,N,N,N*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN), respectively (Fig. 5A). Unexpectedly, although copper is an essential micronutrient in most living organisms (Vulpe and Packman, 1995), we observed no detectable growth defect in *F. oxysporum* grown under copper limitation (Fig. 5A), even in the presence of BCS concentrations up to 1 mM (data not shown). A similar result has been reported previously in *Aspergillus fumigatus* (Park *et al.*, 2014). By contrast, depletion of iron and zinc resulted in severe growth defects, as expected. In any case, inactivation of Fub1 had no additional effect on growth

(Fig. 5A). Next, we asked whether Fub1 was required for fungal growth at toxic concentrations of copper, iron or zinc. When the wild-type and *fub1*Δ strains were grown on GMM with up to 5 mM of the different metal ions, no significant differences were observed between strains (Fig. 5B). These results demonstrate that FA is not essential for growth under limiting or toxic concentrations of copper, iron or zinc. However, we noted that transcript levels of *fub1* were significantly reduced in the presence of these three metal ions (Fig. 5C).

FA toxicity in tomato plants is reversed by the exogenous addition of copper, iron and zinc

The production and phytotoxic properties of FA have been studied over the past 75 years (Bacon *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2014; Gäumann, 1957, 1958; Yabuta *et al.*, 1937), and a number of mechanisms for FA toxicity have been suggested, most related to modifications in the plant cell membrane (D'Alton and Etherton, 1984). To test FA toxicity, roots of 3-week-old tomato plants were immersed in sterile water with or without FA. Plants maintained in the presence of 0.5–1 mM FA exhibited a progressive depigmentation of the stem, most probably a result of anthocyanin degradation, followed by a general loss of turgor and, finally, wilting of the entire plant (Fig. 6A). Importantly, the external addition of copper, iron or zinc, either to the FA solution or by foliar spraying, a process by which leaves can take up ions through the stomata and distribute them throughout the plant (Eddings and Brown, 1967; Neumann and Prinz, 1975), rendered plants more resistant to FA and significantly increased stem strength and pigmentation (Fig. 6B–D). Furthermore, the phytotoxic effect of FA was partially recapitulated by immersion of the roots in a solution containing the membrane-permeable chelator TPEN (Fig. 7), but not the membrane-impermeable chelators BPS or BCS (data not shown). Collectively, these results suggest that the phytotoxicity of FA is mediated by chelation of metal ions inside the plant.

FA is a virulence factor of *F. oxysporum* on tomato plants and immunodepressed mice

We noted that the expression of *fub1* in *F. oxysporum* was markedly up-regulated during the early stages of plant infection (Fig. 8A) and therefore tested the role of FA production in virulence. Tomato plants whose roots were inoculated with conidia of the *F. oxysporum* wild-type or *fub1*Δ^C strains showed progressive wilt symptoms and usually died before day 25 post-inoculation (dpi) (Fig. 8B). In contrast, plants inoculated with the *fub1*Δ mutant displayed a significantly reduced mortality rate (Fig. 8B) and most survived the assay, developing only mild disease symptoms. Moreover, the amount of fungal biomass in roots and stems was markedly reduced in *fub1*Δ in comparison with the wild-type and complemented

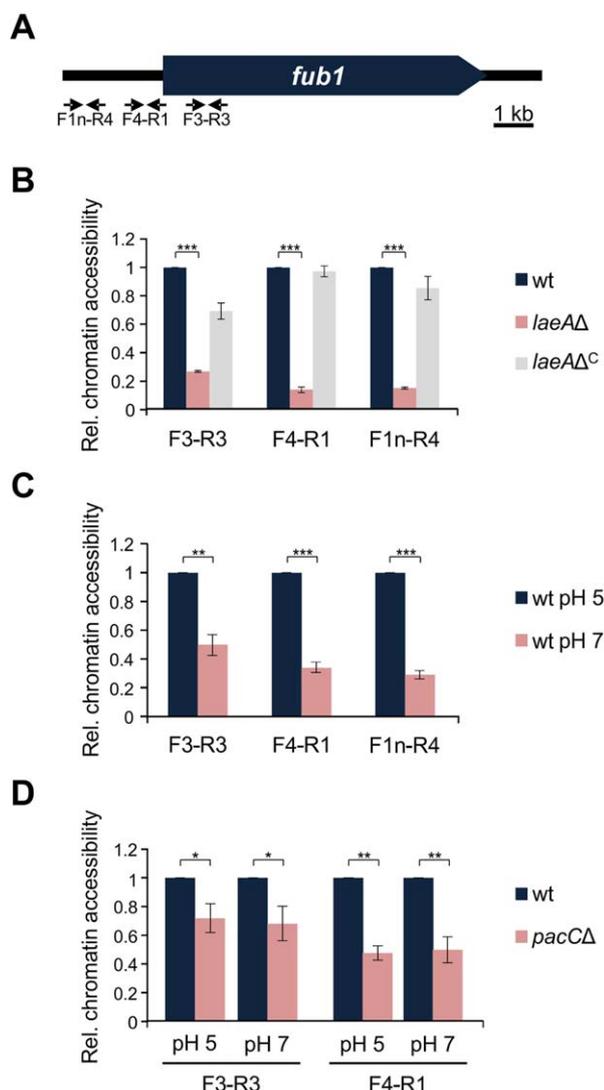


Fig. 4 LaeA, pH and PacC regulate chromatin modifications at the *fub1* locus. (A) Physical map of the promoter region of the *fub1* gene located in the fusaric acid (FA) gene cluster. Primers used for chromatin analysis are indicated. (B–D) Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) performed on genomic DNA (gDNA) of the indicated strains grown as in Fig. 3B, C. Relative chromatin accessibility was calculated as the ratio of amplification levels obtained with gDNA from untreated mycelia versus gDNA from micrococcal nuclease (MNase)-treated mycelia, and represented relative to that of the wild-type (B), the wild-type at pH 5 (C) or the wild-type at different pH values (D), with each of the indicated primer pairs (see Table S1). wt, wild-type strain. Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

strains (Fig. 8C). Thus, FA is required for full virulence of *F. oxysporum* in tomato plants.

As the tomato pathogenic *F. oxysporum* strain can also infect and kill immunosuppressed mice (Ortoneda *et al.*, 2004), we tested the role of FA production during infection of a mammalian

host. Inoculation with 10^7 conidia of the wild-type or *fub1*Δ^C strain resulted in the killing of all animals before 15 dpi (Fig. 9A), and transcripts of *fub1* were detected inside the host (Fig. S6, see Supporting Information). However, animals inoculated with two independent *fub1*Δ mutants showed significantly delayed mortality (Fig. 9A). In contrast with plant infection, the fungal burden in kidney, liver and lung of surviving mice did not differ significantly between the strains (Fig. 9B). These results suggest that FA contributes to the virulence of *F. oxysporum* in mammals, but is not required for dissemination in the host.

DISCUSSION

FA was discovered almost 80 years ago (Yabuta *et al.*, 1937) and was the first fungal toxin whose production was detected in *planta* (Gäumann, 1957). Its strong phytotoxicity (Niehaus *et al.*, 2014; Stipanovic *et al.*, 2011), moderate toxicity in animals (Porter *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 2015) and bacteria (Bacon *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2015), and its pharmacological properties (Song and Yee, 2001; Wang and Ng, 1999), make the study of FA biosynthesis and regulation of great interest. Moreover, FA inhibits the growth of fungi, including its producer *Fusarium*. However, FA-producing strains use a variety of strategies, such as active export or enzymatic modification, to protect themselves from the toxin (Crutcher *et al.*, 2015; Studt *et al.*, 2016). Since the recent discovery of the FA biosynthetic gene cluster, different components of the cluster have been characterized (Brown *et al.*, 2012, 2015; Niehaus *et al.*, 2014; Studt *et al.*, 2016). Inactivation of Fub1, the PKS acting in the first step of the FA biosynthetic pathway, completely abolishes the production of FA and its derivatives in different *Fusarium* species (Brown *et al.*, 2012; Niehaus *et al.*, 2014) (this work). Here, we used targeted deletion of *fub1* to demonstrate, for the first time, a role of FA in the virulence of the cross-kingdom pathogen *F. oxysporum* on plant and mammalian hosts.

Chromatin-mediated regulation of FA production

The regulation of FA production has been studied for almost 80 years. Initially, it was proposed that FA was mainly produced under alkaline conditions (Yabuta *et al.*, 1939), whereas later studies suggested that nitrogen sufficiency and slightly acidic media were optimal for FA production (Pitel and Vining, 1970). Here, we compared two different media, potato dextrose (PD) and Czapek-Dox (CD), in both solid and liquid versions. Although PD is a richer and more complex medium, we found that the production of FA was higher in CD, a medium that has been known for a long time to promote FA production (Löffler and Mouris, 1992). By contrast, Bik and Bea were preferentially produced in PD. The exact reason for this difference is currently unknown. We hypothesized that pH could act as a key regulatory factor, and observed significantly higher *fub1* expression and FA production at pH 5 relative to pH 7. Our results are in contrast with those reported in *F.*

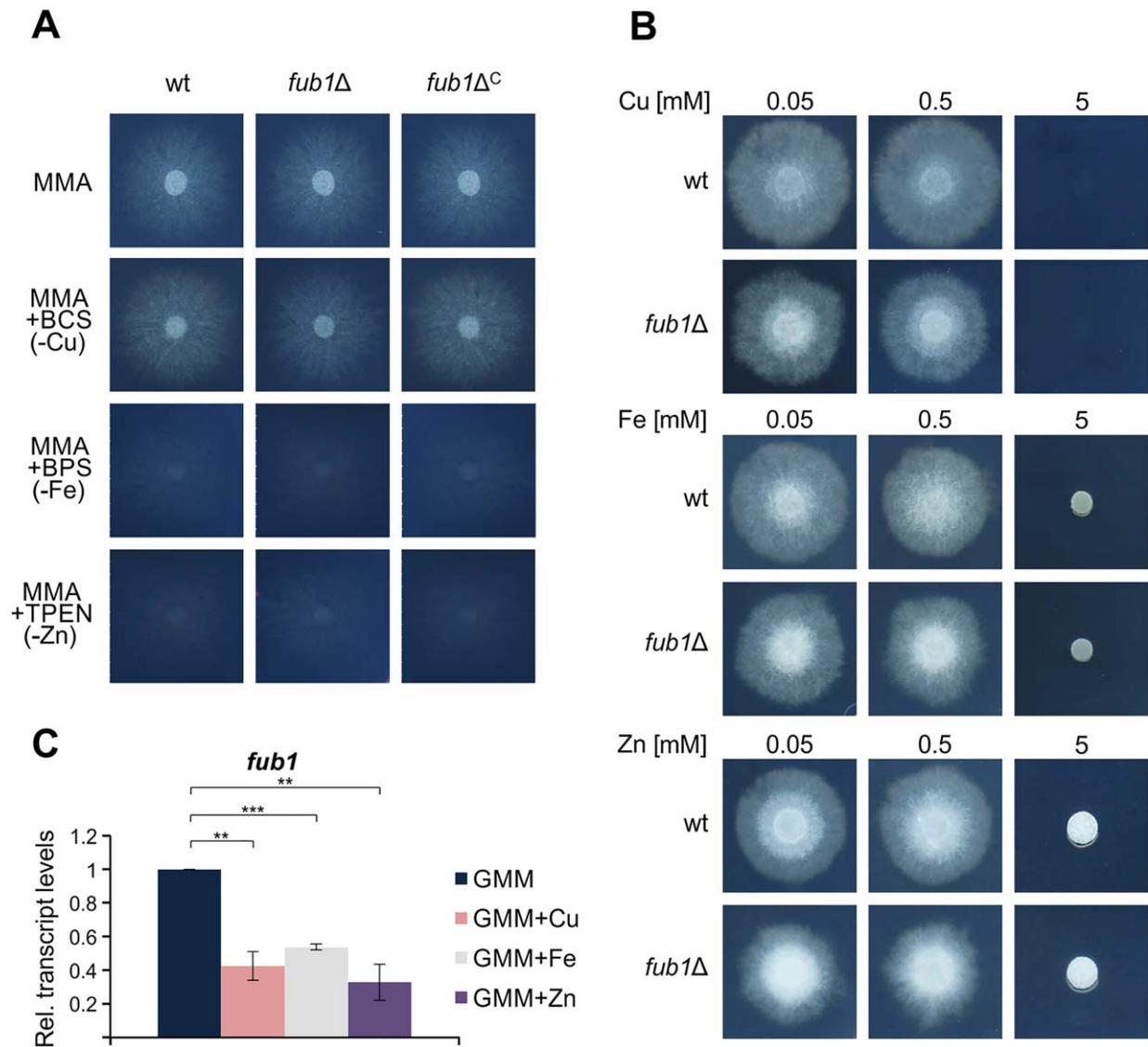


Fig. 5 Expression of *fub1* is repressed by copper, iron and zinc. (A) Growth of the indicated strains on minimal medium agar (MMA) with or without the indicated metal chelators. Plates were cultured for 3 days at 28 °C. (B) Growth of the indicated strains on solid glutamine minimal medium (GMM) supplemented with the indicated concentrations of copper, iron or zinc. Plates were cultured for 3 days at 28 °C. (C) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the wild-type strain germinated for 16 h in GMM without copper, iron or zinc and then supplemented, or not, with 50 μM CuSO₄, FeSO₄ or ZnSO₄ for 2 h. Transcript levels of *fub1* are expressed relative to those in GMM. wt, wild-type strain; BCS, bathocuproinedisulfonic acid disodium salt; BPS, bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt hydrate; TPEN, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine. Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. ***P* < 0.001; ****P* < 0.0001.

fujikuroi, showing a higher expression of *fub1* at pH 8 relative to pH 4, requiring the alkaline pH regulator PacC (Niehaus *et al.*, 2014). We also confirmed that PacC is required for full expression of *fub1* at both pH 5 and pH 7. The seemingly contradictory results between *F. oxysporum* and *F. fujikuroi* could be explained by the different experimental conditions used in the two studies: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-buffered versus unbuffered media, respectively (Niehaus *et al.*, 2014). It is known that the pH of an unbuffered culture can change rapidly during fungal growth.

However, the optimum pH for *fub1* expression and FA production in *F. oxysporum* could be around pH 5 or higher, a range in which PacC is still active. In line with this hypothesis, *pacC* transcript levels were similar at pH 5 and pH 7, but almost undetectable at pH 4 (Caracuel *et al.*, 2003). The global regulator of secondary metabolism LaeA (Bok and Keller, 2004; Butchko *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2010) has been shown previously to regulate FA production in *Fusarium* (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014). LaeA contains a conserved S-

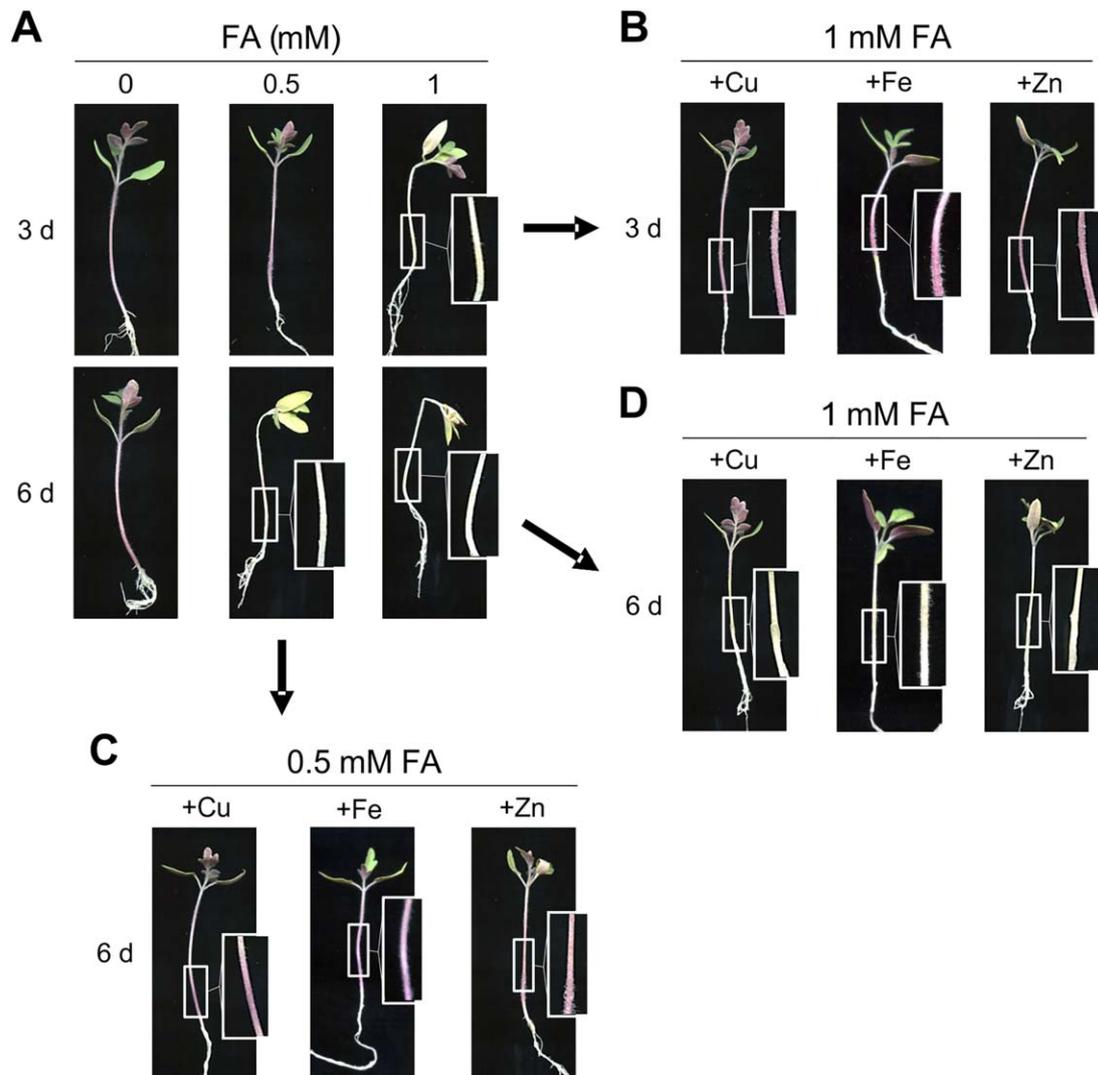


Fig. 6 Phytotoxic effect of fusaric acid (FA) on tomato plants is remediated by exogenous copper, iron or zinc. (A) Roots of 3-week-old seedlings of tomato plants (cultivar Monika) were immersed in sterile water with the indicated concentrations of FA for 3 and 6 days. (B–D) Leaves of plants were sprayed with 0.025% CuSO₄, FeSO₄ or ZnSO₄ solutions before immersing roots in FA solution. Boxed areas are shown at double magnification.

adenosylmethionine (SAM)-binding site essential for its function, contributes to histone H3 lysine 9 trimethylation (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010) and links transcriptional and epigenetic control of gene expression (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014). In line with previous reports suggesting a positive role of LaeA in FA biosynthesis (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Niehaus *et al.*, 2014), we showed here that the inactivation of LaeA leads to a significant decrease in chromatin accessibility at the FA gene cluster. These findings, together with the reduced expression of the *hph* gene when inserted at the site of *fub1*, suggest a major regulatory function of LaeA in remodelling chromatin structure at the *F. oxysporum* FA locus. In addition, we showed that moderate acidic pH and PacC contribute to an increase in chromatin accessibility at the *fub1* locus. Although our data suggest that this

contribution requires LaeA, this remains to be confirmed experimentally. The fact that inactivation of LaeA has, by far, the strongest effect on the expression of the FA gene cluster and FA production suggests that other stimuli, such as nutrients or pH, may converge on this master regulator of secondary metabolism to regulate expression of the gene cluster.

FA has long been known for its ability to chelate metal ions (Lakshminarayanan and Subramanian, 1955; Malini, 1966; Pan *et al.*, 2010; Tamari and Kaji, 1952). However, the regulation of FA biosynthesis by metals has not been studied so far. Here, we showed that transcript levels of *fub1* are negatively regulated by copper, iron or zinc. Similarly, transcript levels of *sidC*, a LaeA-regulated gene functioning in the biosynthesis of the siderophore ferriochelin, are also down-regulated in the presence of iron

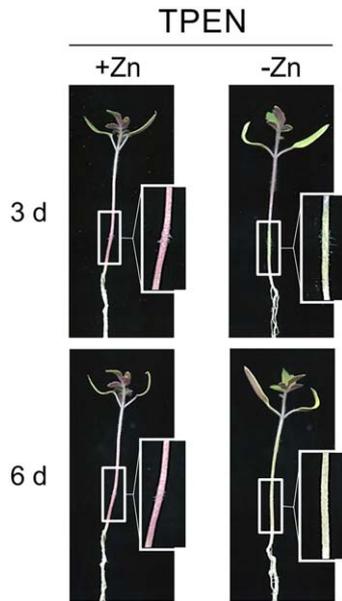


Fig. 7 The membrane-permeable zinc chelator *N,N,N,N*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) causes similar phytotoxicity symptoms in tomato plants to fusaric acid. Leaves of tomato plants were pretreated, or not, with a 0.025% ZnSO_4 solution and roots were immersed in sterile water containing $4 \mu\text{M}$ of the zinc chelator TPEN for 3 and 6 days. Boxed areas are shown at double magnification.

(Eisendle *et al.*, 2004; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Perrin *et al.*, 2007). Although this suggests that FA might function in metal uptake, we found that *fub1* was not essential for the growth of *F. oxysporum* in copper-, iron- or zinc-limiting conditions, most probably because more specific and efficient uptake mechanisms are present in filamentous fungi, such as high-affinity copper and zinc transporters (Park *et al.*, 2014; Vicentefranqueira *et al.*, 2005) and siderophore-assisted iron uptake (Schrettl and Haas, 2011). Alternatively, metal-chelating FA might be used by *Fusarium* to inhibit microbial competitors in the soil or to improve growth at toxic metal concentrations. Indeed, FA is exported in *F. fujikuroi* and *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* via the Major Facilitator Superfamily (MFS) transporters Fub11 and FubT, respectively (Crutcher *et al.*, 2015, Studt *et al.*, 2016). However, we found that a lack of FA production was not detrimental during fungal growth in toxic copper, iron or zinc conditions.

Mechanism of FA phytotoxicity and role in virulence

Early studies established the phytotoxic activity of FA and its role in the induction of wilt symptoms in plants (Gäumann, 1957, 1958; Yabuta *et al.*, 1937). Our study confirmed that tomato seedlings develop typical wilt symptoms when their roots are exposed to FA. The fact that wilting was observed in the cotyledons and lower leaves suggests that FA is transported and distributed

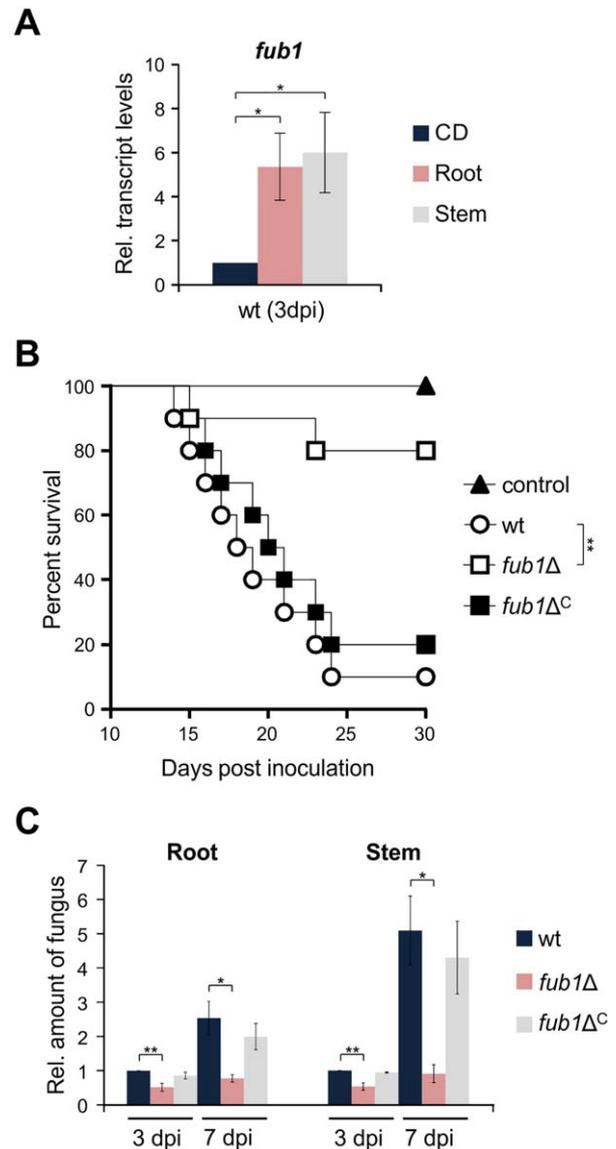


Fig. 8 Fusaric acid (FA) production is required for full virulence of *Fusarium oxysporum* on tomato plants. (A) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the wild-type strain germinated for 16 h in potato dextrose broth (PDB) and then transferred to Czapek-Dox liquid (CDL) for 3 h or for inoculated tomato roots and stems at 3 days post-inoculation (dpi). Transcript levels of *fub1* are expressed relative to those in CDL. (B) Groups of 10 tomato plants (cultivar Monika) were inoculated by dipping roots into a suspension of 5×10^6 freshly obtained microconidia/mL of the indicated fungal strains. Percentage survival was plotted for 30 days. Data shown are from one representative experiment. Experiments were performed three times with similar results. (C) Quantitative real-time PCR was used to measure the relative amount of fungal DNA in total genomic DNA extracted from tomato roots and stems at 3 and 7 dpi with the indicated strains. Amplification levels are expressed relative to those of plants infected with the wild-type strain. wt, wild-type strain. Bars represent standard deviations from two independent biological experiments with three technical replicates each. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

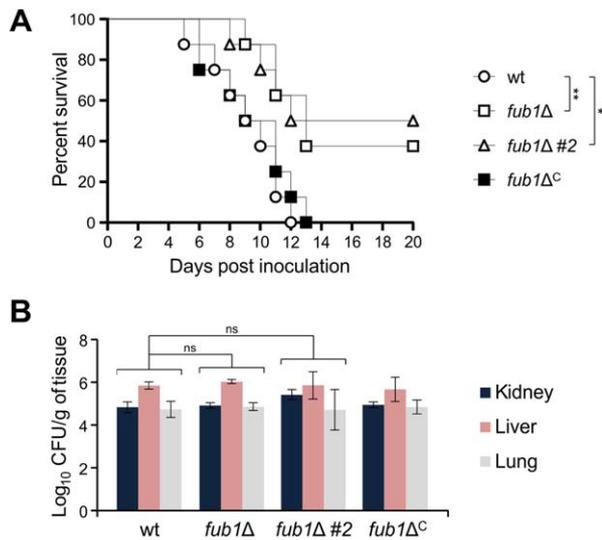


Fig. 9 Fusaric acid (FA) is a virulence factor in mice. (A) Groups of 10 immunosuppressed Oncins France 1 male mice were inoculated with 10^7 microconidia of the indicated strains by lateral tail vein injection. Percentage survival was plotted for 20 days. Data shown are from one representative experiment. Experiments were performed three times with similar results. (B) Four randomly chosen surviving mice inoculated with 10^7 microconidia of the indicated strains were sacrificed at 5 days post-inoculation (dpi) and homogenates obtained from the indicated organs were quantitatively cultured on potato dextrose agar (PDA). wt, wild-type strain. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; ns, not significant.

throughout the entire plant. Similar wilt symptoms have been reported in water melon seedlings (Hong-Sheng *et al.*, 2008).

The precise mechanism of phytotoxicity of FA remains unknown. A number of studies have suggested that it could be related to its ability to chelate different metal ions (Gäumann, 1958; Lakshminarayanan and Subramanian, 1955; Ruiz *et al.*, 2015; Tamari and Kaji, 1952). Here, we showed that the addition of copper, iron or zinc to FA-treated plants significantly reduces wilting. Importantly, the inhibition of FA toxicity was also functional when the metal ions and FA were applied to different parts of the plant (leaves and roots, respectively), indicating that the chelating mechanism occurs inside the plant. This is further supported by the fact that the membrane-permeable metal chelator TPEN, but not the membrane-impermeable chelators BPS or BCS, was able to exert a toxic effect similar to that of FA. Although additional mechanisms of FA toxicity cannot be ruled out, our results clearly support a causal link between FA phytotoxicity and metal chelation.

FA is one of the first fungal toxins for which a functional role in virulence has been proposed (Gäumann, 1957, 1958) and several studies have provided circumstantial evidence linking FA production to plant pathogenicity (Dong *et al.*, 2014; Gapillout *et al.*, 1996; Venter and Steyn, 1998). However, to date, no formal proof for such a role has been provided. Here, we demonstrated that mutants lacking *fub1*, which are unable to produce FA or its

derivatives, are significantly reduced in their capacity to cause mortality in tomato plants. Interestingly, these mutants also caused less mortality in immunosuppressed mice, showing, for the first time, the relevance of FA production during fungal infection of mammals. Although the pH of mammalian blood is around pH 7.3, which is not favourable for FA production, small amounts of FA might be sufficient to promote fungal virulence in mammals. In addition, it cannot be ruled out that FA production is under positive regulation inside the host. Indeed, FA has been shown previously to be produced in blood cultures in an *LaeA*- and *VeA*-dependent manner (Lopez-Berges *et al.*, 2013). Previously, the mycotoxin *Bea* has also been shown to contribute to infection of *F. oxysporum* in plants and mice. This suggests that the production of secondary metabolites, many of which are regulated by the Velvet complex and *LaeA*, could play a role in the capacity of *F. oxysporum* to attack both plant and animal hosts. In line with this idea, mutants lacking *VeA* or *LaeA* are significantly attenuated in virulence on tomato plants and mice (Lopez-Berges *et al.*, 2013), as are Velvet complex mutants in other human and plant pathogenic fungi (Bok *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Laskowski-Peak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Lopez-Berges *et al.*, 2013; Merhej *et al.*, 2012; Myung *et al.*, 2009; Webster and Sil, 2008; Wiemann *et al.*, 2010). Additional studies, including investigations on the combinatory/synergistic effects of co-occurring mycotoxins, are required to fully understand the role of secondary metabolite production in the cross-kingdom pathogenicity of *F. oxysporum*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fungal isolates and culture conditions

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* race 2 wild-type isolate 4287 (FGSC 9935) was used in all experiments. Fungal strains were stored as microconidial suspensions at -80°C with 30% glycerol. For the extraction of gDNA and microconidia production, cultures were grown in PDB at 28°C (Di Pietro and Roncero, 1998). For the analysis of gene expression and relative chromatin accessibility, freshly obtained microconidia were germinated for 14–16 h in PDB or GMM. Germlings were harvested by filtration, washed three times in sterile water and transferred to fresh PDB, CDL or GMM with or without $50\ \mu\text{M}$ CuSO_4 , FeSO_4 or ZnSO_4 for the indicated time periods. pH 5 and pH 7 buffered conditions were achieved using 100 mM MES, when indicated. For the determination of colony growth, 2×10^4 microconidia were spotted onto PDA, CDA, minimal medium agar (MMA) or GMM with or without FA (0–0.75 mg/mL), with or without 200 μM BPS, 200 μM BCS or 4 μM TPEN, and with or without CuSO_4 , FeSO_4 or ZnSO_4 (0.05–5 mM). Plates were incubated at 28°C for the indicated time periods. All experiments included two replicates and were performed at least three times with similar results.

Fungal strains

PCRs were routinely performed with VELOCITY™ DNA Polymerase (Bioline, London, UK) using an MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Madrid,

Spain) (see Table S1, Supporting Information, for a complete list of primer sequences used in this study). All fungal transformations and purification of the transformants by monoconidial isolation were performed as described previously (Di Pietro and Roncero, 1998). The cassette for targeted replacement of the entire coding region of the *F. oxysporum fub1* gene with the hygromycin B resistance marker (Punt *et al.*, 1987) was assembled by a fusion PCR method (Szewczyk *et al.*, 2006). DNA fragments flanking the *fub1* coding region were amplified from gDNA of *F. oxysporum* wild-type with the primers *fub1-F1* + *fub1-R1* and *fub1-F2* + *fub1-R2*, respectively, whereas the hygromycin B resistance marker, under the control of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter and *trpC* terminator, was amplified from the pAN7-1 plasmid (Punt *et al.*, 1987) with primers *fub1-hph-F* + *fub1-hph-R*. The three DNA fragments were then PCR fused with the primers *fub1-F1n* + *fub1-R2n*. The *fub1Δ* allele obtained was used to transform protoplasts of the *F. oxysporum* wild-type strain to hygromycin B resistance (Fig. S1B). Transformants showing homologous insertion of the construct were genotyped by PCR of gDNA with primers *fub1-F1* + *fub1-R2* (not shown) and by Southern blot analysis (Fig. S1C). To generate a construct for complementation of the *fub1Δ* strain, a 9645-bp fragment, spanning from 1077 bp upstream of the wild-type *F. oxysporum fub1* translation initiation codon to 1092 bp downstream of the translation termination codon, was amplified by PCR with the primers *fub1-F1* + *fub1-R2*. The amplified fragment was used to co-transform protoplasts of the *fub1Δ* strain with the phleomycin B resistance gene under the control of the *A. nidulans gpdA* promoter and *trpC* terminator, amplified from the pAN8-1 plasmid (Mattern *et al.*, 1988) with the primers *gpdA*-15b + *trpC*-8b (Fig. S2A). Several phleomycin-resistant co-transformants were analysed for the presence of a functional *fub1* allele by PCR with the gene-specific primers *fub1-F3* + *fub1-R3* (Fig. S2B). Among the different complemented strains, we selected one in which the production of FA and derivatives (Fig. 1) and *fub1* transcript levels returned to wild-type values (Fig. S2C, D).

Nucleic acid manipulations and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA and gDNA were extracted from *F. oxysporum* mycelia following previously reported protocols (Chomczynski and Sacchi, 1987; Raeder and Broda, 1985). The quality and quantity of extracted nucleic acids were determined by running aliquots in ethidium bromide-stained agarose gels and by spectrophotometric analysis in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), respectively. Routine nucleic acid manipulations were performed according to standard protocols (Sambrook and Russell, 2001). DNA and protein sequence databases were searched using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Quantitative RT-PCR was performed as described previously (Lopez-Berges *et al.*, 2010, 2012) using FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain) in a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad). Gene-specific primers (see Table S1) were designed to flank an intron, if possible. Transcript levels were calculated by comparative ΔCt and normalized to *act1*.

Analysis of chromatin structure

Mycelia of *F. oxysporum* strains grown under the indicated conditions were harvested by filtration, lyophilized and ground to a fine powder in a

Mini-BeadBeater 8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). Nuclease digestion was performed as described previously (Basheer *et al.*, 2009; Gonzalez and Scazzocchio, 1997; Lopez-Berges *et al.*, 2013). Briefly, 20 mg of lyophilized mycelium was suspended in 1 mL of MNase buffer (250 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂), and 300 mL of the suspension were treated for 5 min with 3 U of MNase (Sigma, Madrid, Spain) at 37 °C. The reaction was terminated by adding stop buffer [2% sodium dodecylsulfate (SDS), 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)]. DNA was obtained by phenol–chloroform extraction, precipitated, washed with 70% ethanol, dissolved in water and treated with RNAse (see Fig. S5). Quantitative real-time PCR was performed as described above using promoter- and gene-specific primers (see Table S1). Chromatin accessibility was expressed by comparative ΔCt as the ratio between amplification levels from untreated gDNA relative to those obtained from MNase-digested gDNA. Values were presented relative to those of the wild-type strain.

Mycotoxin quantification

The quantification of FA and derivatives was performed as described previously (Lopez-Berges *et al.*, 2013). Samples were obtained from fungal colonies grown for 3 days at 28 °C on PDA or CDA, and from mycelia and supernatant of the wild-type strain germinated in PDB for 16 h, and then transferred for 3 h to fresh PDB or CDL buffered to pH 5 or pH 7. Samples were homogenized in acetonitrile–water–glacial acetic acid (79 : 20 : 1, v/v/v) with a Homogenizer Workcenter T10 basic (IKA®, Wilmington, NC, USA) for 1 min at a rate of 4 mL solvent per gram of sample. The mix was re-homogenized after 2 min of repose, filtered, centrifuged for 10 min at 12 000 g and the supernatant was lyophilized. Dry crude extracts were reconstituted in the solvent, and mycotoxin detection and quantification were performed with a QTrap 5000 LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a TurbolonSpray electrospray ionization (ESI) source and a 1290 Series UPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany), as described previously (Malachova *et al.*, 2014). Supernatant samples were lyophilized directly and then reconstituted in the solvent for quantification.

Determination of FA toxicity on tomato plants

Three-week-old seedlings of tomato plants (cultivar Monika) were individually root immersed in inoculum tubes containing pH 6 sterile water with different FA concentrations or 200 μM BPS, 200 μM BCS or 4 μM TPEN, and placed in a glasshouse for the indicated time periods. Copper, iron and zinc foliar spraying was performed, when indicated, 2 h before root immersion. Briefly, plant roots were carefully covered with cling film and leaves were sprayed twice with 0.025% CuSO₄, FeSO₄ or ZnSO₄ in 0.1% Tween-20 solution. When the leaves were completely dry, the roots were washed three times in sterile water before immersion in the indicated solutions. Symptoms were monitored daily and scored 3 and 6 days after FA or chelator treatment.

Plant infection assays

Tomato root inoculation assays were performed as described previously (Di Pietro and Roncero, 1998) using 2-week-old tomato seedlings (cultivar Monika). The severity of disease symptoms and plant survival were

recorded daily for 30 days. Ten plants were used for each treatment. Virulence experiments were performed at least three times with similar results. Plant survival was calculated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. Data were analysed with the software GraphPad Prism 4. The quantification of fungal biomass *in planta* was performed as described previously (Pareja-Jaime *et al.*, 2010) using total gDNA extracted from tomato roots or stems infected with *F. oxysporum* strains at 3 or 7 dpi. Relative amounts of fungal gDNA were calculated by comparative ΔCt of the *Fusarium act1* gene normalized to the tomato *EF α 1* gene (see Table S1).

Animal infection assays

Mice were cared for in accordance with the principles outlined by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series, No. 123; <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>). Experimental conditions were approved by the Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine, Universitat Rovira i Virgili. Infection assays with immunodepressed mice were performed as described previously (Ortoneda *et al.*, 2004). Briefly, groups of 10 Oncins France (OF) 1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were immunosuppressed with an intraperitoneal 200 mg/kg dose of cyclophosphamide (Laboratorios Funk S.A., Barcelona, Spain) 2 days before inoculation, and then every 5 days, and infected by injecting 0.2 mL of an inoculum of 10^7 conidia into a lateral vein of the tail. Survival was recorded daily for the indicated time periods. Infection experiments with each individual strain were performed at least three times. Survival was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. To determine fungal tissue burden, randomly chosen surviving mice inoculated with 10^7 conidia were sacrificed at 5 dpi. Kidneys, livers and lungs were aseptically removed, weighed and homogenized in sterile saline, and 10-fold serial dilutions were spread onto PDA. The plates were incubated at 28 °C, the colonies were counted after 3 days and the number of colony-forming units (CFU) per gram of organ was calculated. Fungal colony counts were converted to \log_{10} and compared using the analysis of variance test. Data were analysed with the software GraphPad Prism 4.

Accession numbers

Sequence data can be found in the GenBank/EMBL database or in the *Fusarium* Comparative Genome database under the following accession numbers: Fub1, FOXG_15248; Act1, FOXG_01569; EF α 1, NC_015443; pAN7-1 (PgpdA-hygr-TtrpC), Z32698; pAN8-1 (PgpdA-phleor-TtrpC), Z32751.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Esther Martínez Aguilera (Universidad de Córdoba, Spain) for technical assistance. We thank Professor Hamid Reza Zamanzadeh (Islamic Azad University Tehran, Iran) and Dr Antonio Moretti (Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy) for helpful discussions. This research was supported by the following grants: BIO2013-47870-R from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO); CVI-7319 from the Junta de Andalucía; and Marie Curie FP7-PEOPLE-ITN-607963 FUNGBRAIN from the European Commission. C.L.-D. has an FPI fellowship from MINECO. V.G. has an ERASMUS fellowship

from the European Commission. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1981) *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (Cook, R. ed), pp. 391–399. University Park, PA: Penn State University Press.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. and Leslie, J.F. (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4039–4043.
- Bacon, C.W., Hinton, D.M. and Hinton, A. Jr. (2006) Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 185–194.
- Basheer, A., Berger, H., Reyes-Dominguez, Y., Gorfer, M. and Strauss, J. (2009) A library-based method to rapidly analyse chromatin accessibility at multiple genomic regions. *Nucleic Acids Res.* **37**, e42.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall’asta, C., Saeger, S.D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G. and Stroka, J. (2013) Masked mycotoxins: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 165–186.
- Bok, J.W. and Keller, N.P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*, **3**, 527–535.
- Bok, J.W., Balajee, S.A., Marr, K.A., Andes, D., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C. and Keller, N.P. (2005) LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell*, **4**, 1574–1582.
- Brown, D.W., Butchko, R.A., Busman, M. and Proctor, R.H. (2012) Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 521–532.
- Brown, D.W., Lee, S.H., Kim, L.H., Ryu, J.G., Lee, S., Seo, Y., Kim, Y.H., Busman, M., Yun, S.H., Proctor, R.H. and Lee, T. (2015) Identification of a 12-gene fusaric acid biosynthetic gene cluster in *Fusarium* species through comparative and functional genomics. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **28**, 319–332.
- Butchko, R.A., Brown, D.W., Busman, M., Tudzynski, B. and Wiemann, P. (2012) Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 602–612.
- Caracul, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., Gonzalez-Verdejo, C.I., Garcia-Maceira, F.I. and Di Pietro, A. (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **48**, 765–779.
- Crutcher, F.K., Liu, J., Puckhaber, L.S., Stipanovic, R.D., Bell, A.A. and Nichols, R.L. (2015) FUBT, a putative MFS transporter, promotes secretion of fusaric acid in the cotton pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Microbiology*, **161**, 875–883.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- D’Alton, A. and Etherton, B. (1984) Effects of fusaric acid on tomato root hair membrane potentials and ATP levels. *Plant Physiol.* **74**, 39–42.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. and Foster, G.D. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 414–430.
- Di Pietro, A. and Roncero, M.I. (1998) Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**, 91–98.
- Dong, X., Xiong, Y., Ling, N., Shen, Q. and Guo, S. (2014) Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1399–1408.
- Eddings, J.L. and Brown, A.L. (1967) Absorption and translocation of foliar-applied iron. *Plant Physiol.* **42**, 15–19.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P. and Haas, H. (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, **3**, 561–563.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L. and Gurr, S.J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, **484**, 186–194.

- Fridkin, S.K. (2005) The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1455–1460.
- Gapillout, I., Milat, M.L. and Blein, J.P. (1996) Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 127–132.
- Gäumann, E. (1957) Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*, **47**, 342–357.
- Gäumann, E. (1958) The mechanism of fusaric acid injury. *Phytopathology*, **48**, 670–686.
- Gonzalez, R. and Scazzocchio, C. (1997) A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3955–3956.
- Hong-Sheng, W., Wei, B., Dong-Yang, L., Ning, L., Rong-Rong, Y., Waseem, R., Shen, Q.R. (2008) Effect of fusaric acid on biomass and photosynthesis of watermelon seedlings leaves. *Caryologia*, **61**, 258–268.
- Jiang, J., Liu, X., Yin, Y. and Ma, Z. (2011) Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, **6**, e28291.
- Jiao, J., Zhou, B., Zhu, X., Gao, Z. and Liang, Y. (2013) Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells. *Planta*, **238**, 727–737.
- Lakshminarayanan, K. and Subramanian, D. (1955) Is fusaric acid a vivotoxin? *Nature*, **176**, 697–698.
- Laskowski-Peak, M.C., Calvo, A.M., Rohrsen, J. and Smulian, A.G. (2012) VEA1 is required for cleistothecial formation and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 838–846.
- Lee, J., Myong, K., Kim, J.E., Kim, H.K., Yun, S.H. and Lee, Y.W. (2012) FgVelB globally regulates sexual reproduction, mycotoxin production and pathogenicity in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, **158**, 1723–1733.
- Löffler, H.J.M. and Mouris, J.R. (1992) Fusaric acid: phytotoxicity and in vitro production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*, the causal agent of basal rot in lilies. *Neth. J. Plant Pathol.* **98**, 107–115.
- Lopez-Berges, M.S., Rispail, N., Prados-Rosales, R.C. and Di Pietro, A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, **22**, 2459–2475.
- Lopez-Berges, M.S., Capilla, J., Turra, D., Schafferer, L., Matthijs, S., Jochl, C., Cornelis, P., Guarro, J., Haas, H. and 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.
- Lopez-Berges, M.S., Hera, C., Sulyok, M., Schafer, K., Capilla, J., Guarro, J. and Di Pietro, A. (2013) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* **87**, 49–65.
- Ma, L.J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Diener, A., Gale, L.R., Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hillburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C. and Rep, M. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, **464**, 367–373.
- Malachova, A., Sulyok, M., Beltran, E., Berthiller, F. and Krska, R. (2014) Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A*, **1362**, 145–156.
- Malini, S. (1966) Heavy metal chelates of fusaric acid: in vitro spectrophotometry. *J. Phytopathol.* **57**, 221–231.
- Marré, M.T., Vergani, P. and Albergoni, F.G. (1993) Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**, 141–157.
- Mattern, I.E., Punt, P.J. and van den Hondel, D.A. (1988) A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Genet. News*, **35**, 25.
- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K.E., Richard-Forget, F. and Barreau, C. (2012) The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 363–374.
- Myung, K., Li, S., Butchko, R.A., Busman, M., Proctor, R.H., Abbas, H.K. and Calvo, A.M. (2009) FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5089–5094.
- Neumann, P.M. and Prinz, R. (1975) Foliar iron spray potentiates growth of seedlings on iron-free media. *Plant Physiol.* **55**, 988–990.
- Niehaus, E.M., von Barga, K.W., Espino, J.J., Pfannmuller, A., Humpf, H.U. and Tudzynski, B. (2014) Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1749–1762.
- Nucci, M. and Anaissie, E. (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 695–704.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracul, Z., Roncero, M.I., Mayayo, E. and Di Pietro, A. (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* **72**, 1760–1766.
- Pan, J.H., Lin, Y.C., Tan, N. and Gu, Y.C. (2010) Cu(II): a “signaling molecule” of the mangrove endophyte *Fusarium oxysporum* ZZF51? *Biomaterials*, **23**, 1053–1060.
- Pareja-Jaime, Y., Martin-Urdiroz, M., Roncero, M.I., Gonzalez-Reyes, J.A. and 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.
- Park, Y.S., Lian, H., Chang, M., Kang, C.M. and Yun, C.W. (2014) Identification of high-affinity copper transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **73**, 29–38.
- Pavlovkin, J. (1998) Effect of fusaric acid on the electrical properties of maize root hairs plasmalemma. *Agriculture*, **44**, 350–355.
- Perrin, R.M., Fedorova, N.D., Bok, J.W., Cramer, R.A., Wortman, J.R., Kim, H.S., Nierman, W.C. and Keller, N.P. (2007) Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* **3**, e50.
- Pitel, D.W. and Vining, L.C. (1970) Accumulation of dehydrofusaric acid and its conversion to fusaric and 10-hydroxyfusaric acids in cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Can. J. Biochem.* **48**, 623–630.
- Porter, J.K., Bacon, C.W., Wray, E.M. and Hagler, W.M. Jr. (1995) Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Nat. Toxins*, **3**, 91–100.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, **56**, 117–124.
- Raeder, U. and Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* **1**, 17–22.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. and Strauss, J. (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **76**, 1376–1386.
- Ruiz, J.A., Bernar, E.M. and Jung, K. (2015) Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS One*, **10**, e0117040.
- Samadi, L. and Shahsavani Behboodi, B. (2006) Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. *Planta*, **225**, 223–234.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarikaya-Bayram, O., Bayram, O., Feussner, K., Kim, J.H., Kim, H.S., Kaefer, A., Feussner, I., Chae, K.S., Han, D.M., Han, K.H. and Braus, G.H. (2014) Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Dev. Cell*, **29**, 406–420.
- Schrettl, M. and Haas, H. (2011) Iron homeostasis-Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 400–405.
- Song, J.J. and Yee, N.K. (2001) A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+)-fusarinolic acid. *J. Org. Chem.* **66**, 605–608.
- Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S., Liu, J. and Bell, A.A. (2011) Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. *Toxicol.* **57**, 176–178.
- Strange, R.N. and Scott, P.R. (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 83–116.
- Studt, L., Janevska, S., Niehaus, E.M., Burkhardt, I., Arndt, B., Sieber, C.M., Humpf, H.U., Dickschat, J.S. and Tudzynski, B. (2016) Two separate key enzymes and two pathway-specific transcription factors are involved in fusaric acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *Environ. Microbiol.* **18**, 936–956.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A. and Oakley, B.R. (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**, 3111–3120.

- Tamari, K. and Kaji, J. (1952) Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant-growth. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **26**, 345–349.
- Venter, S.L. and Steyn, P.J. (1998) Correlation between fusaric acid production and virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* that causes potato dry rot in South Africa. *Potato Res.* **41**, 289–294.
- Vicentefranqueira, R., Moreno, M.A., Leal, F. and Calera, J.A. (2005) The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot Cell*, **4**, 837–848.
- Vulpe, C.D. and Packman, S. (1995) Cellular copper transport. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 293–322.
- Wang, H. and Ng, T.B. (1999) Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid). *Life Sci.* **65**, 849–856.
- Webster, R.H. and Sil, A. (2008) Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14 573–14 578.
- Wiemann, P., Brown, D.W., Kleigrew, K., Bok, J.W., Keller, N.P., Humpf, H.U. and Tudzynski, B. (2010) FfVcl1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Microbiol.* **77**, 972–994.
- Yabuta, T., Kambe, K. and Hayashi, T. (1937) Biochemistry of the bakanae fungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **10**, 1059–1068.
- Yabuta, T., Sumiki, Y., Aso, K., Tamura, T., Igarashi, H. and Tamari, K. (1939) Biochemical studies on the bakanae fungus. IV. The culture conditions for producing gibberellin or fusaric acid. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **15**, 1209–1220.
- Yin, E.S., Rakhmankulova, M., Kucera, K., de Sena Filho, J.G., Portero, C.E., Narvaez-Trujillo, A., Holley, S.A. and Strobel, S.A. (2015) Fusaric acid induces a notochord malformation in zebrafish via copper chelation. *Biomaterials*, **28**, 783–789.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Fig. S1 Identification of the *Fusarium oxysporum* fusaric acid (FA) gene cluster and *fub1* knockout strategy. (A) Conserved synteny between *Fusarium fujikuroi* and *F. oxysporum* FA gene clusters. Note that the two genes inserted between *fub3* and *fub4* in *F. oxysporum* are present in *F. fujikuroi* in another chromosome. (B) *Fusarium oxysporum* *fub1* locus and targeted gene disruption construct. (C) Southern blot analysis. Genomic DNA of the indicated strains was treated with *XhoI*, separated on a 0.7% agarose gel, transferred to a nylon membrane and hybridized with the DNA probe indicated in (B). wt, wild-type.

Fig. S2 Generation and selection of the *fub1Δ* complemented strain (*fub1Δ^C*). (A) Strategy of *fub1Δ* complementation by co-

transformation with a *fub1* wild-type allele and the phleomycin resistance marker. The relative positions of the polymerase chain reaction (PCR) primers used for genotyping are indicated. *phleo^r*, phleomycin resistance gene. (B) PCR amplification of genomic DNA (gDNA) of the indicated strains using primers F3 and R3. The complemented strains, *fub1Δ^C* and *fub1Δ^C #2*, produce a banding pattern consistent with the integration of an intact *fub1* allele. wt, wild-type strain. (C) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) performed in the indicated strains germinated for 16 h in potato dextrose broth (PDB) and transferred for 3 h to Czapek-Dox liquid (CDL). Transcript levels of *fub1* are expressed relative to those in the wild-type strain. Bars represent standard errors from two independent biological experiments with three technical replicates each. (D) The amounts of fusaric acid (FA) and fusarinic acid (FnA) in cultures of the indicated strains, grown for 3 days on Czapek-Dox agar (CDA), were quantified by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and expressed as nanograms per millilitre of extract.

Fig. S3 Mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) with or without fusaric acid (FA). Growth of the indicated strains cultured for 3 days at 28 °C. wt, wild-type.

Fig. S4 Mycelial growth in Czapek-Dox agar (CDA) with or without hygromycin B. Growth of the indicated strains cultured for 3 days at 28 °C. wt, wild-type.

Fig. S5 Nucleosomal repeat length in *Fusarium oxysporum*. Genomic DNA was extracted from lyophilized mycelium of the indicated strains, treated with micrococcal nuclease (MNase) for 5 min at 37 °C (T), separated in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. DNA extracted from untreated mycelium was loaded as a control (UT). M, DNA marker. wt, wild-type.

Fig. S6 *Fusarium oxysporum* *fub1* is expressed during infection of mice. (A, B) Melt curves in quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments of the indicated samples. Note the detection of a non-specific amplicon in mice samples which makes quantification impossible.

Table S1 Primers used in this study.



Improved Assembly of Reference Genome *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Strain Fol4287

Dilay Hazal Ayhan,^a Cristina López-Díaz,^b Antonio Di Pietro,^b  Li-Jun Ma^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of Massachusetts Amherst, Amherst, Massachusetts, USA

^bDepartment of Genetics, University of Córdoba, Córdoba, Spain

ABSTRACT *Fusarium oxysporum* is a pathogenic fungus that infects hundreds of plant species. This paper reports the improved genome assembly of a reference strain, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol4287, a tomato pathogen.

Fusarium oxysporum is a filamentous fungus that can infect hundreds of plant species, as well as immunocompromised human patients (1). The reference genome of *F. oxysporum* was first generated using Sanger sequencing with 6× coverage using a tomato-infecting strain, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol4287 (race 2, VCG 0030) (2). The strain was originally isolated from an infected tomato plant in Murcia by Javier Tello from the University of Almería, Spain (2, 3). It is available from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC 9935), NCAUR/USDA (NRRL 34936), and CBS-KNAW (CBS 123668) collections. A comparative study of this reference genome with those of closely related species identified lineage-specific (LS) chromosomes that are rich in transposons and genes related to pathogenicity. The transfer of these LS chromosomes between strains of *F. oxysporum* was experimentally confirmed to convert a nonpathogenic strain into a pathogen (2, 4–6). These studies enabled the structural and functional partitioning of the *F. oxysporum* genome, which provides a novel means of dissecting fungal pathogenesis.

Unfortunately, this reference genome has a high level of single-nucleotide-level sequencing errors due to the low sequencing coverage. To improve its quality, we regenerated the whole-genome assembly with increased sequence coverage and combining Illumina and PacBio sequence technologies. Genomic DNA was extracted from the mycelium of Fol4287 (the same isolate that was sequenced before). The DNA library for short reads was prepared with an average 400-bp insert size. The DNA library was sequenced at 66× coverage, using the Illumina HiSeq 2500 platform, into 71-bp paired-end reads. The genomic DNA was sequenced using the PacBio RS II system with 10× subread coverage. FastQC (version 0.11.5) was used to check the quality of all reads. The average base quality of Illumina reads is 36.8, with a 71-bp read length. The PacBio reads have average and maximum read lengths of 6.8 kb and 52 kb, respectively.

The initial assembly was generated via SPAdes version 3.9.1 (7), combining raw Illumina and PacBio reads with default parameters. Quiver in SMRT Analysis (version 2.2.0) (8) was used to polish the assembly based on the PacBio reads. Further polishing was performed by mapping the Illumina reads to the assembly using BWA version 0.7.12 (9). FreeBayes v0.9.10-3-g47a713e (10) was used to identify base variants between the reads and the assembly. Highly confident variant sites were used to correct the assembly using a custom script (available at github.com/d-ayhan/tools). We also used structural variant (SV) callers, GRIDSS version 1.4.1 (11) and Sniffles version 1.0.8 (12), to identify the SVs in the initial assembly. All identified SVs were inspected manually to ensure accuracy. High-confidence merges/splits were integrated into the

Received 11 July 2018 **Accepted** 14 August 2018 **Published** 13 September 2018

Citation Ayhan DH, López-Díaz C, Di Pietro A, Ma L-J. 2018. Improved assembly of reference genome *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain Fol4287. *Microbiol Resour Announc* 7:e00910-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.00910-18>.

Editor Antonis Rokas, Vanderbilt University

Copyright © 2018 Ayhan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Li-Jun Ma, lijun@biochem.umass.edu.

assembly. The improved assembly was then quality checked by remapping. This process was repeated until no future correction could be identified.

The final assembly is 53.9 Mb, with 499 contigs and an N_{50} value of 1.3 Mb. The largest contig size is 5.7 Mb. The GC content is 47.7%. The assembly includes a contig of 52,424 bp that captures the complete mitochondrial DNA and a contig of 7,875 bp of the complete ribosomal DNA sequence (2). In a comparison of the new assembly to the reference assembly of *F. oxysporum* (assembly [GCA_000149955](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445)) by BLAST, the contigs that belong to each chromosome were identified, ordered, and oriented within each chromosome. The contigs were divided into three categories, including 11 core chromosomes (C), 4 LS chromosomes (S), and some unmapped contigs (U). Except for chromosomes 1 and 2, each core chromosome was assembled into a single contig GenBank assembly number ([GCA_003315725](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445)).

Data availability. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number [QESU00000000](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445). The version described in this paper is version QESU01000000. The PacBio and Illumina reads are available in SRA under accession numbers [SRR7015920](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445) and [SRR7690004](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445), respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the MGHPCC for providing high-performance computing capacity for the genome assembly process.

D.H.A. and L.-J.M. are supported by the Burroughs Wellcome Foundation (grant 1014893). C.L.-D. is supported by the Spanish MINECO (grant BES-2014-070450). This work was supported by the United States Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture (grants 2011-35600-30379 and MASR-2009-04374) and the National Science Foundation (IOS-1652641), and MINECO (grant BIO2016-78923-R).

REFERENCES

- Ma L-J, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol* 67:399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>.
- Ma L-J, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M-J, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim W-B, Woloshuk C, Xie X, Xu J-R, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A, Brown DW, Butchko RAE, Chapman S, Coulson R, Coutinho PM, Danchin EGJ, 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 Y-H, Li L, Manners JM, Miranda-Saavedra D, Mukherjee M, Park G, Park J, Park S-Y, Proctor RH, Regev A, Ruiz-Roldan MC, Sain D, et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367–373. <https://doi.org/10.1038/nature08850>.
- Di Pietro A, Roncero MI. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 11:91–98. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.2.91>.
- Kistler HC, Rep M, Ma L-J. 2013. Structural dynamics of *Fusarium* genomes, p 31–41. In Rown DW, Proctor RH (ed), *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. Horizon Scientific Press, Norwich, United Kingdom.
- Ma L-J. 2014. Horizontal chromosome transfer and rational strategies to manage *Fusarium* vascular wilt diseases. *Mol Plant Pathol* 15:763–766. <https://doi.org/10.1111/mpp.12171>.
- van Dam P, Fokkens L, Schmidt SM, Linmans JHJ, Kistler HC, Ma L-J, Rep M. 2016. Effector profiles distinguish *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Environ Microbiol* 18:4087–4102. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13445>.
- Antipov D, Korobeynikov A, McLean JS, Pevzner PA. 2016. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics* 32:1009–1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>.
- Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- Garrison E, Marth G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv arXiv:1207.3907v2 [q-bio.GN]. <https://arxiv.org/abs/1207.3907>.
- Cameron DL, Schröder J, Penington JS, Do H, Molania R, Dobrovic A, Speed TP, Papenfuss AT. 2017. GRIDSS: sensitive and specific genomic rearrangement detection using positional de Bruijn graph assembly. *Genome Res* 27:2050–2060. <https://doi.org/10.1101/gr.222109.117>.
- Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, Fang H, Nattestad M, von Haeseler A, Schatz MC. 2018. Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods* 15:461–468. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0001-7>.