



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

**Mecanismos de señalización por nitrógeno en el hongo
fitopatógeno *Fusarium oxysporum***

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

David Segorbe Luque

Dirigido por:

Dr. Antonio di Pietro y Dr David Turrà

Profesor Titular y Doctor contratado

Córdoba, 2014

TITULO: *Mecanismos de señalización por nitrógeno en el hongo fitopatógeno
Fusarium oxysporum*

AUTOR: *David Segorbe Luque*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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



TÍTULO DE LA TESIS: Mecanismos de señalización por nitrógeno en el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

DOCTORANDO/A: David Segorbe Luque

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).

Las rutas de señalización MAP quinasas (MAPKs) están presentes en todos los organismos eucariotas y controlan una gran variedad de respuestas celulares a estímulos ambientales. Estudios previos han demostrado el papel fundamental de una cascada MAPK, denominada Fmk1, en la virulencia del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, no se conocen las señales que regulan la actividad de dicha ruta durante el proceso de infección.

En el presente trabajo se ha caracterizado el mecanismo molecular que determina la regulación de la ruta MAPK Fmk1 por fuentes de nitrógeno. Se observó que el amonio ejerce un efecto represor sobre la actividad de la ruta y, por tanto, inhibe las funciones de virulencia de *Fusarium*. El efecto represor del amonio requiere su transporte a través de la proteína MepB, que conlleva una acidificación del medio. En una serie de experimentos de análisis "western blot" se demostró, que el pH ambiental actúa como un regulador maestro de la actividad de tres distintas rutas MAPK. Se observó, además, la interacción cruzada entre las varias vías MAPK. Se procedió a generar mutantes individuales y dobles en las tres rutas MAPK y se llevó a cabo una caracterización detallada de sus fenotipos, revelando efectos sinérgicos entre las distintas rutas.

Las conclusiones y resultados muestran que el pH ambiental juega un papel clave en el desarrollo y la patogénesis de *Fusarium*, y que el hongo utiliza la modificación del pH para activar el crecimiento invasor. Dada la naturaleza conservada de estas cascadas de señalización, este conocimiento podría utilizarse como nueva diana para controlar las infecciones fúngicas. Parte de estos resultados se recogen en un artículo publicado en la revista *Annual Review of Phytopathology*, y otros dos artículos se encuentran en fase avanzada de preparación.

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

Córdoba, 27 de noviembre de 2014

Firma del/de los director/es

Fdo.: Antonio Di Pietro

David Turrà

Agradecimientos

A mi familia y a tod@s

mis compañe@s

Índices

Índice de contenido

Resumen	1
Introducción.....	5
1. El género <i>Fusarium</i>	7
1.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	7
1.2. Biología	8
1.3. Ciclo de vida.....	9
1.4. El proceso de infección	9
1.5. Desarrollo y control de la fusariosis vascular.....	11
1.6. Mecanismos de infección.....	12
1.7. Interacción planta-patógeno.....	13
1.8. Genes fúngicos esenciales para la patogénesis.....	14
1.9. <i>Fusarium oxysporum</i> como patógeno oportunista de mamíferos.....	16
1.10. <i>Fusarium oxysporum</i> como modelo de infección multihospedador.....	17
2. Cascadas de transducción de señales	19
2.1. Rutas MAPK en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.1.1. Ruta de respuesta a feromona	20
2.1.2. Ruta de crecimiento filamentoso.....	21
2.1.3. Ruta de integridad de la pared celular	22
2.1.4. Ruta en respuesta a estrés osmótico mediada por Hog1	23
2.2. Rutas MAPKs en hongos patógenos	24
2.2.1. Homólogos de la ruta Fus3/Kss1	25
2.2.2. Homólogos de la ruta de Slit2/Mpk1	28
2.2.3. Homólogos de la ruta Hog1	29
2.3. Ruta MAPK de la patogenicidad en <i>F. oxysporum</i> (Fmk1).....	30
2.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre las funciones de virulencia mediadas por Fmk1	32
OBJETIVOS.....	35
Materiales y Métodos	39
3. Materiales	41
3.1. Material biológico	41

3.1.1. Bacterias.....	41
3.1.2. Hongos	41
3.1.3. Material vegetal	42
3.1.4. Material animal	42
3.2. Vectores de clonación	42
3.3. Medios de cultivo	43
3.3.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	43
3.3.2. Medios para <i>F. oxysporum</i>	43
3.3.3. Compuestos químicos.....	44
3.4. Oligonucleótidos.	45
3.5. Programas informáticos y páginas webs.....	45
4. Métodos	46
4.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos	46
4.1.1. <i>E. coli</i>	46
4.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	47
4.1.3. Plantas de tomate	47
4.2. Aislamiento de ácidos nucleicos	47
4.2.1. Aislamiento de ADNp de <i>E.coli</i> con CTAB.....	47
4.2.2. Extracción de ADNg de <i>F. oxysporum</i>	48
4.3. Manipulación de los ácidos nucleicos	49
4.3.1. Electroforesis de los ácidos nucleicos en gel de agarosa	49
4.3.2. Recuperación de fragmentos de geles de agarosa	49
4.3.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos	49
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
4.4.1. PCR estándar	51
4.4.2. PCR de marcaje de la sonda	52
4.4.3. Construcción de mutantes nullos mediante Split-marker	52
4.5. Transformación genética	53
4.5.1. Transformación de <i>E. coli</i>	53
4.5.2. Transformación de <i>F. oxysporum</i>	54
4.6. Ensayos de patogenicidad	56
4.6.1. Infección de plantas de tomate	56
4.6.2. Infección de <i>Galleria mellonella</i>	57
4.6.3. Ensayo de producción de poligalacturosas extracelulares	57

4.6.4. Ensayo de penetración de membranas de celofán	58
4.6.5. Ensayo de aglutinación de hifas	58
4.6.6. Medición de amonio	58
4.7. Análisis de proteínas MAPK.....	59
4.7.1. Obtención de las muestras	59
4.7.2. Extracción de proteínas	59
4.7.3. Cuantificación proteica.....	60
4.7.4. Electroforesis desnaturante en geles de acrilamida	60
4.7.5. Análisis western blot	61
Resultados	63
5. Papel del transporte de amonio en la represión de las funciones de virulencia. 65	
5.1. Identificación y mutación del gen <i>mepB</i> (<i>FOXG_00462</i>).....	65
5.2. MepB necesario para la utilización del amonio.....	67
5.3. MepB contribuye de forma minoritaria a la infección de plantas	68
5.4. La represión de las funciones de virulencia por amonio requiere MepB. ...	69
6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el pH.....	70
6.1. Consecuencias del uso de la fuente de nitrógeno en el balance de protones	70
6.2. El pH y no la fuente de nitrógeno regula las funciones de virulencia	73
6.3. El pH regula el nivel de fosforilación de distintas MAPKs.....	78
7. Búsqueda de proteínas que median la fosforilación de las MAPKs en respuesta a pH en <i>F. oxysporum</i>	80
7.1. Sho1, Msb2 y PacC: su papel en fosforilación de Fmk1.	80
7.2. Mpk1 y Hog1 intervienen en la desfosforilación de Fmk1 en respuesta a pH ácido.	82
7.2.1. Identificación e interrupción génica el gen <i>hog1</i> (<i>FOXG_03618</i>).....	83
7.2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes MAPK.....	84
7.2.3. Mpk1 y Hog1 contribuyen a la desfosforilación de Fmk1 a pH ácido. 93	
Discusión	99
8. Discusión	101
8.1. El transporte de amonio conlleva una acidificación del medio	101
8.2. El pH extracelular regula la virulencia de <i>F. oxysporum</i> reprogramando la fosforilación de las MAPKs.....	102
8.3. La defosforilación de Fmk1 en respuesta a acidificación extracelular está regulada por la proteína transmembrana Sho1.	103

8.4. Las tres rutas MAPK regulan distintos aspectos de la virulencia en <i>F. oxysporum</i>	104
8.5. Las distintas MAPKs cooperan la respuesta a cambios del pH extracelular	106
Conclusiones	111
Bibliografía	115

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de esporas de <i>F. oxysporum</i>	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i>	9
Figura 3. Estadios de la infección de <i>F. oxysporum</i> expresando la proteína verde fluorescente GFP, en plantas de tomate.....	10
Figura 4. Rutas MAPKs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figura 5. Regulación del ciclo celular a través de las rutas MAPK en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Figura 6. Cascadas MAPK en hongos patógenos.	25
Figura 7. La MAPK Fmk1 de <i>F. oxysporum</i> no es necesaria para el crecimiento vegetativo pero sí para el crecimiento invasivo y para la infección en plantas de tomate.....	31
Figura 8. Modelo preliminar de la regulación negativa de las funciones de virulencia en <i>F. oxysporum</i> mediada por amonio, MeaB y TOR.....	33
Figura 9. Esquema de delección génica mediante la técnica de Split-marker.	53
Figura 10. Distintos estadios de la fusariosis vascular en plantas de tomate.	57
Figura 11. delección del gen <i>mepB</i>	66
Figura 12. Efecto de la delección de <i>mepB</i> y <i>meaB</i> en la utilización de fuentes de nitrógeno.....	67
Figura 13. MepB y MeaB tienen un papel minoritario en la infección de plantas de tomate.....	68
Figura 14. La represión por el amonio de la aglutinación de hifas y la penetración del celofán requiere MepB.	70
Figura 15. Efecto diferencial de la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el pH del medio.	71
Figura 16. MepB es necesario para el transporte del amonio y la consiguiente acidificación del medio.	72
Figura 17. El pH y no la fuente de nitrógeno regula el crecimiento invasivo en membranas de celofán.....	75
Figura 18. El pH regula el crecimiento invasor en <i>F. oxysporum</i>	75
Figura 19. El pH regula la aglutinación de hifas.....	76
Figura 20. El pH es un factor clave en la regulación de la infección de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.....	77
Figura 21. <i>F. oxysporum</i> alcaliniza el medio durante la infección de raíces de tomate.....	78
Figura 22. El pH regula el nivel de fosforilación de las tres MAPKs de <i>F. oxysporum</i> , Fmk1, Mpk1 y Hog1.	79
Figura 23. Sho1 contribuye a la represión del crecimiento invasivo a pH ácido. ...	81

Figura 24. Sho1 es necesario para la desfosforilación completa de Fmk1 inducida por pH ácido.	82
Figura 25. Delección del gen hog1.....	84
Figura 26. Efecto de la delección individual y combinada de las distintas MAPKs de <i>F. oxysporum</i> sobre la respuesta a estrés de temperatura, pared y oxidativo.	85
Figura 27. Efecto de la delección individual y combinada de las distintas MAPKs de <i>F. oxysporum</i> sobre la respuesta a estrés osmótico y a fungicidas.....	87
Figura 28. Fmk1 promueve la actividad pectinolítica de <i>F. oxysporum</i> mientras Mpk1 y Hog1 la reprimen.	87
Figura 29. Mpk1 es necesario para la represión del crecimiento invasivo a pH ácido.	89
Figura 30. Hog1 contribuye al crecimiento invasivo en presencia de aminoácidos.....	90
Figura 31. Fmk1 promueve la aglutinación de hifas, mientras que Hog1 la reprime.	91
Figura 32. Mpk1 y Hog1 contribuyen de forma aditiva a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.	92
Figura 33. Mpk1 y Hog1 contribuyen de forma aditiva a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en <i>G. mellonella</i>	93
Figura 34. La delección de <i>fmk1</i> no afecta el patrón de fosforilación de Mpk1 y Hog1 en respuesta a pH.	94
Figura 35. Mpk1 y Hog1 son necesarios para la rápida desfosforilación de Fmk1 inducida por acidificación.....	94
Figura 36. La delección simultánea de dos MAPKs produce la hiperfosforilación de la tercera MAPK.	95
Figura 37. Mpk1 y Hog1 contribuyen a la desfosforilación de Fmk1 inducida por pH ácido.	96
Figura 38. Msb2 y Sho1 contribuyen a la fosforilación de Fmk1 a pH ligeramente alcalino.....	97
Figura 39. Sho1 contribuye a la desfosforilación de Fmk1.	97
Figura 41. Modelo de regulación por pH de las MAPKs en <i>F. oxysporum</i>	106

Índice tablas

Tabla 1 . Razas existentes en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>.....	14
Tabla 2 . Genes de <i>F. oxysporum</i> con fenotipo en la patogénesis vegetal. ...	15
Tabla 3 . Genes de <i>F.oxysporum</i> afectados en patogénesis vegetal y animal.	17
Tabla 4 . Homólogos de Fus3/Kss1 caracterizados en hongos fitopatógenos.	27
Tabla 5 . Cepas bacterianas usadas en este trabajo.	41
Tabla 6 . Cepas fúngicas usadas en este trabajo.	41
Tabla 7 . Material vegetal usado en este trabajo.....	42
Tabla 8 . Material animal usado en este trabajo.....	42
Tabla 9 . Plásmidos usados en este estudio	42
Tabla 10 .Soluciones de almacenamiento de compuestos químicos.....	44
Tabla 11 . Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	45
Tabla 12 .Programas informáticos usados para el análisis de datos en este trabajo.....	46
Tabla 13 . Condiciones de PCR.....	51
Tabla 14 .Valores P obtenidos en el ensayo de infección de plantas de tomate..	68

RESUMEN

Resumen

Las rutas de señalización MAP quinasa (MAPK) están presentes en todos los organismos eucariotas y controlan gran variedad de respuestas celulares a estímulos ambientales. Estudios previos han demostrado el papel fundamental de una MAPK, denominada Fmk1, en la virulencia del hongo patógeno del suelo *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, no se conocen las señales que regulan la actividad de dicha ruta durante el proceso de infección, solo se han descrito dos receptores transmembrana, denominados Msb2 y Sho1, que regulan esta ruta.

En el presente trabajo se ha caracterizado el mecanismo molecular que determina la regulación de la ruta MAPK Fmk1 por fuentes de nitrógeno. Se observó que el amonio ejerce un efecto represor sobre la actividad de la ruta y, por lo tanto, inhibe las funciones de virulencia de *Fusarium*. El efecto represor del amonio requiere su transporte a través de la proteína MepB, y conlleva una acidificación del medio. En una serie de experimentos de análisis "western blot" se demostró, que el pH ambiental actúa como un regulador maestro de la actividad de las tres rutas MAPK de *F. oxysporum*. Se observó, además, la interacción cruzada entre las distintas MAPKs. Se procedió a generar mutantes individuales y dobles en las tres rutas MAPK y se llevó a cabo una caracterización detallada de sus fenotipos relevando efectos sinérgicos entre las distintas rutas.

Summary

The MAP kinase signaling pathways (MAPK) are present in all eukaryotic organisms and control a variety of cellular responses to environmental stimuli. Previous studies have demonstrated the crucial role of MAPK, called Fmk1 in pathogen virulence soil fungus *Fusarium oxysporum*. However, the signals that regulate the activity of the infection pathway are not known, there are only described two transmembrane receptors, called Msb2 and Sho1, which ones regulate this route.

In this study we have characterized the molecular mechanism that determines the regulation of MAPK pathway Fmk1 in respond for different nitrogen sources. Observed that ammonia has a repressive effect on the activity of the pathway and, therefore, inhibits the virulence functions of *F. oxysporum*. The repressor effect of ammonium requires transport through MepB protein, and leads to acidification of the medium. In a series of experiments of analysis "western blot" was shown, that the environmental pH acts as a master regulator of the activity of the three MAPK pathways in *F. oxysporum*. The cross-talk between different MAPKs were also observed. It was proceeded to generate single and double mutants in the three MAPK pathways and conducted a detailed characterization of their phenotypes relieving synergies between the different routes.

INTRODUCCIÓN

1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de ascomicetos que pertenecen a la clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Nectriaceae*. Se encuentra ampliamente distribuido tanto en suelos naturales como en suelos cultivados, e incluye numerosas especies, la mayoría patógenos vegetales capaces de causar marchitez vascular en numerosos cultivos y de producir toxinas letales para especies animales (Moss & Smith, 1982, Moss & Smith, 2011). También incluye estirpes no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluidos humanos inmunodeprimidos (Ortoneda *et al.*, 2004, Vartivarian *et al.*, 1993). Algunas especies del género se utilizan en el control biológico de plagas o en la producción de metabolitos secundarios de interés comercial, como la ciclosporina o las giberelinas (Desjardins *et al.*, 1993), y en la obtención de biomasa fúngica para la elaboración de una amplia gama de alimentos (Wiebe, 2002). Algunas especies pueden completar el ciclo sexual, mientras que otras sólo presentan ciclo asexual (Burnett, 1984).

Debido a las pérdidas económicas originadas por la infección con este género, y a la facilidad para su cultivo y manejo en el laboratorio, existe un gran interés en el estudio de los mecanismos fundamentales de la patogénesis fúngica. Los modelos de patógenos aéreos foliares más importantes son *Magnaporthe oryzae* y *Ustilago maydis* que infectan, el arroz y el maíz, respectivamente. Sin embargo, existen pocos modelos para estudiar patógenos del suelo.

1.1. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum se describe como un patógeno de plantas, con hifas hialinas y septadas, y sin ciclo sexual conocido. Es capaz de parasitar más de 120 cultivos diferentes, además de infectar a personas inmunodeprimidas. *F. oxysporum* es un patógeno del suelo, que se ha convertido en un excelente modelo de experimentación puesto que ofrece la posibilidad de estudiar tanto el proceso de infección en plantas como en mamíferos. Así, *F. oxysporum* ha sido propuesto como el primer modelo de patógeno multihospedador en hongos (Ortoneda *et al.*, 2004).

En 1940, Snyder y Hansen acuñaron el término *forma specialis* (f. sp) para definir la capacidad de un aislado de *F. oxysporum* de causar enfermedad en una determinada especie, género o grupo vegetal. Por ejemplo, la cepa empleada en este trabajo patógena en tomate (*Lycopersicon esculentum*) se denomina *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Hoy en día, el concepto de *forma specialis* sigue en uso y aunque algunas infectan a un hospedador único, para otras el rango es más amplio y actúan sobre un grupo restringido de especies vegetales.

Las relaciones filogenéticas entre aislados sugieren que la capacidad para infectar una especie vegetal ha surgido independientemente varias veces a lo largo de la evolución (O'Donnell *et al.*, 1998, Baayen *et al.*, 2000). Más recientemente, este fenómeno se ha relacionado con la existencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en el genoma de determinadas estirpes, que confieren especificidad para un determinado hospedador (Ma *et al.*, 2010). Por ejemplo, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* posee un total de quince cromosomas de los cuales cuatro son singulares de esta f. sp. (chr. 3, 6, 14 y 15). Hasta el presente no se ha descrito un ciclo sexual en *F. oxysporum*. La considerable variación genética observada en este hongo con reproducción asexual se atribuye a mecanismos alternativos como transposones (Daboussi & Capy, 2003) o la formación de heterocariontes (Teunissen *et al.*, 2002).

1.2. Biología

Fusarium oxysporum forma un micelio de textura algodonosa que puede variar de color, desde blanco a rosa pálido hasta un púrpura intenso, según el aislado y las condiciones ambientales, que también afectan la velocidad de crecimiento, así como la forma, tamaño y abundancia de esporas y número de septos de sus hifas (Booth, 1971). *F. oxysporum* produce tres tipos de esporas sexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas (Figura 1).



Figura 1. Tipos de esporas de *F. oxysporum*. A. Macroconidios. B. Microconidios. C. Clamidosporas.

Los macroconidios, aunque siendo las esporas típicas del género, son las 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. Los microconidios, con una o dos células, son los más abundantes. Se producen con mayor frecuencia y en cualquier circunstancia, presentando formas ovaladas y cilíndricas. Las clamidosporas, de una o dos células, presentan una forma esférica y con pared engrosada. Se originan por la modificación de un segmento de la hifa cuya función es, más que la propagación, la supervivencia durante largos periodos de tiempo (Agrios, 1997).

F. oxysporum se propaga en distancias cortas principalmente por irrigación con agua o por equipos contaminados. Para distancias largas, las esporas de *F. oxysporum* pueden ser transportadas por el viento (Agrios, 1997), encontrándose éstas prácticamente por todo el ecosistema terrestre.

1.3. Ciclo de vida

F. oxysporum se comporta como un típico patógeno del suelo, pudiendo permanecer en forma de clamidospora largos períodos de tiempo en ausencia de planta hospedadora, o creciendo en presencia de restos de materia orgánica o exudados de raíces (estado saprofito) (Beckman, 1987) (Figura 2).

Las plantas sanas pueden infectarse con el hongo si el suelo en el que se encuentran está contaminado. De hecho, una vez que una zona es colonizada por *F. oxysporum*, ésta suele permanecer infectada indefinidamente. Cuando el hongo percibe la proximidad de las raíces, se induce la germinación de las esporas y la penetración en la planta (estado parasítico). Una vez dentro de la planta hospedadora, el hongo alcanza los vasos del xilema, colonizando las partes más altas y provocando la marchitez y la muerte de la planta (estado patogénico).

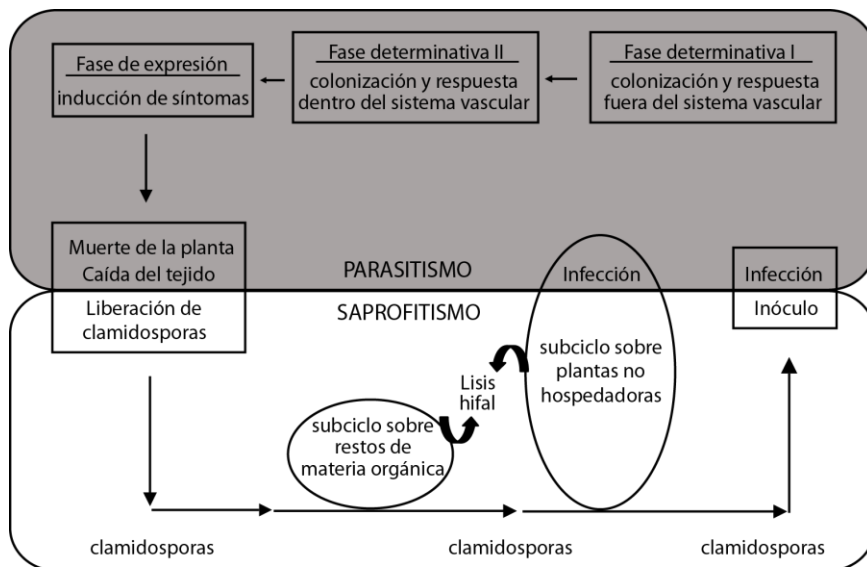


Figura 2. Ciclo de vida de *F. oxysporum*. Adaptado de (Beckman, 1987).

1.4. El proceso de infección

F. oxysporum es capaz de detectar la presencia de una planta hospedadora incluso antes de establecer contacto físico. Esto se debe, muy probablemente, a que los exudados

de las raíces ponen en marcha rutas de transducción de señales del hongo y éste responde mediante la activación de los genes apropiados que regulan el desarrollo y la virulencia. Se conocen múltiples tipos de rutas, entre las que destacan la cascada de la adenosina monofosfato-proteína quinasa A (AMPc-PKA) y las rutas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Rispaill & Di Pietro, 2009).

Tras la adhesión a la superficie de la raíz (Figura 3A), se forma una densa red de hifas que parece contribuir a la penetración (Czymmek *et al.*, 2007, Olivain & Alabouvette, 1999, Rodríguez-Galvez & Mendgen, 1995). La microscopia electrónica ha demostrado la ausencia de estructuras especializadas de penetración en *F. oxysporum* (Olivain & Alabouvette, 1999). Sin embargo, se ha descrito la formación de hifas que penetran a través de huecos presentes entre las células epidérmicas de la raíz y la formación de un septo en el punto de penetración (Pareja-Jaime *et al.*, 2010, Perez-Nadales & Di Pietro, 2011).

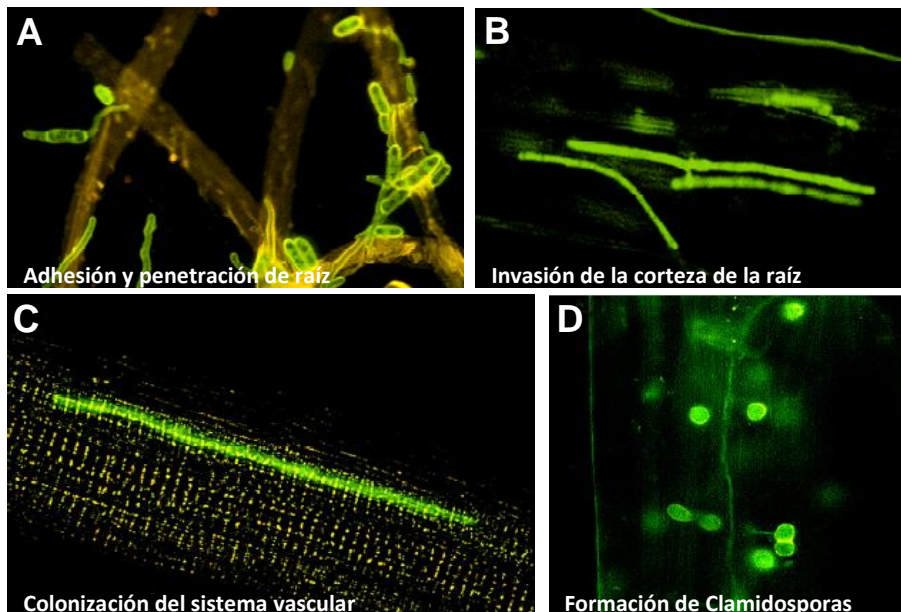


Figura 3. Estadios de la infección de *F. oxysporum* expresando la proteína verde fluorescente GFP, en plantas de tomate. A. Germinación de microconidios y penetración de hifas adheridas a la superficie de la raíz tras 24 horas desde la inoculación. **B.** Hifas del hongo creciendo en el córtex de la raíz tras cinco días. **C.** Hifa creciendo en el interior de los vasos del xilema tras siete días. **D.** Clamidosporas producidas en el tejido muerto de la planta (Di Pietro *et al.*, 2001).

Una vez en el interior de la planta, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil, poniendo en marcha su maquinaria de ataque mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas) (Di

Pietro *et al.*, 2009), la producción de enzimas que degradan los compuestos tóxicos de la planta (Cañero & Roncero, 2008, Pareja-Jaime *et al.*, 2008). Tras superar estas defensas, el hongo invade el córtex radical creciendo por los espacios inter- e intracelulares alcanzando los vasos del xilema a través de orificios (Figura 3B), y utilizándolos como avenidas para colonizar el tallo y las partes aéreas de la planta (Figura 3C). A medida que el micelio crece se producen microconidios, los cuales se dispersan por la planta gracias a la corriente de savia. El hongo también es capaz de avanzar lateralmente penetrando en los vasos del xilema adyacentes (Agrios, 1997).

La proliferación del micelio y el desarrollo de las estructuras de defensa en la planta para detener al patógeno provocan la obstrucción de los vasos conductores originando un desequilibrio hídrico tras el cual, las hojas cierran los estomas, comienzan a amarillear y finalmente se marchitan, junto con el tallo y el resto de la planta. En este momento, el hongo coloniza la planta y crece vigorosamente como saprófito, produciendo una gran cantidad de clamidosporas (figura 3D), que caerán a suelo donde permanecerán hasta la aparición de un nuevo hospedador, cerrándose así el ciclo de infección de *F. oxysporum* (Beckman, 1987).

1.5. Desarrollo y control de la fusariosis vascular

La marchitez vascular por fusariosis se manifiesta inicialmente como un ligero aclaramiento del nervio en la parte exterior de las hojas más jóvenes, seguido de epinastia en las hojas más viejas. En el estadio de plántula, los vegetales infectados por *F. oxysporum* pueden marchitarse y morir poco tiempo después de la aparición de los primeros síntomas. En las plantas de mayor edad aparecen atrofiamiento y amarilleo de las hojas inferiores, la formación de raíces adventicias, la marchitez de las hojas y tallos más jóvenes, la defoliación, la necrosis marginal de las hojas restantes y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 1997). La infección generalmente se desplaza en sentido ascendente a través de la planta, siendo el oscurecimiento del tejido vascular un síntoma característico de la marchitez.

El patógeno tiene una capacidad limitada de invadir tejidos vivos de la planta. Puede crecer en las condiciones pobres de nutrientes de los vasos conductores xilemáticos, pero sólo invaden el resto de la planta cuando ésta se debilita o muere a causa del estrés hídrico. Por otro lado, el bloqueo del xilema a menudo se produce por la propia reacción de la planta frente a la invasión. En estos casos, la planta produce una rápida acumulación de geles vasculares pécticos o bien genera estructuras globosas (tilosas), en un intento por detener el avance y proliferación del hongo. Si la infección inicial no es grave y la planta responde rápidamente, ésta logra contener al patógeno en los vasos conductores. Si por el contrario la infección inicial es elevada y la respuesta de la planta es lenta, ésta es totalmente colonizada

y muere. Es este caso, el hongo crece dentro del xilema hacia los tejidos parenquimáticos y produce clamidosporas (Agrios, 1997).

En la actualidad, el uso de cultivares resistentes es la única medida efectiva y económicamente rentable para controlar la marchitez vascular causada por *F. oxysporum*. A pesar de ello, en muchos lugares del mundo donde la resistencia aún no se ha incorporado a las variedades mejor adaptadas o preferidas, se intentan practicar medidas de control como son los métodos físicos, químicos o biológicos. Los físicos consisten en la esterilización de las semillas y rotación de los cultivos; estos métodos son inocuos para el ambiente pero su eficiencia es limitada, debida a la amplia distribución y persistencia del hongo en el suelo. Los químicos, como los tratamientos con fungicidas son altamente efectivos pero a la vez costosos y dañinos para el medio ambiente. Por último, los biológicos, como el empleo de bacterias y hongos antagonistas o la protección cruzada con aislados de *Fusarium* no patógenos pueden ser eficaces en ocasiones, pero no suelen ser muy fiables ya que son muy sensibles de los factores bióticos y ambientales (Olivain *et al.*, 2003).

1.6. Mecanismos de infección

Los hongos han desarrollado numerosas estrategias con el fin de penetrar, invadir los tejidos, crecer y propagarse en el interior de la planta (Agrios, 1997). A diferencia de bacterias y virus, los hongos al ser multicelulares poseen mecanismos activos de penetración, que superan las barreras vegetales externas mediante una combinación de procesos enzimáticos y mecánicos, un proceso que denominado crecimiento invasor.

Los patógenos que penetran la planta por las zonas aéreas se encuentran con la cutícula, una capa impermeable de cutina que debe ser superada mediante la acción enzimática de cutinasas secretadas y/o mediante la formación de estructuras de infección especializadas, como apresorios o tubos de penetración, que proporcionan la presión necesaria para atravesar la superficie exterior. Por el contrario, en patógenos del suelo la primera barrera física encontrada es la pared celular. Por tanto, se ha postulado que la penetración a través de la raíz requiere la acción de enzimas hidrolíticas como celulasas y pectinasas. Los patógenos fúngicos son muy versátiles en la producción de enzimas extracelulares capaces de degradar la pared celular vegetal, como es el caso de *F. oxysporum*. (Di Pietro *et al.*, 2009).

Tras la penetración los hongos contrarrestan la defensa de la planta secretando toxinas y/o compuestos análogos a hormonas vegetales, como las fitotoxinas, que alteran la fisiología de la planta en beneficio del patógeno. La producción por parte del hongo de moléculas supresoras llamadas efectores, capaces de anular o disminuir la respuesta de defensa de la planta, es considerada como una adaptación al estilo de vida patogénico (Rep

et al., 2005) sobre efectores. Muchos fitopatógenos poseen enzimas que detoxifican los compuestos antifúngicos que la planta produce. Un ejemplo es la tomatinasa, que ha sido bien caracterizada en *F. oxysporum* (Pareja-Jaime *et al.*, 2008, Roldán-Arjona *et al.*, 1999). Su acción no sólo provoca la detoxificación de la α -tomatina, sino que el producto de la hidrólisis de ésta suprime la respuesta de defensa de la planta (Bouarab *et al.*, 2002).

Las moléculas necesarias para la infección se denominan factores de patogenicidad, mientras que aquellas que contribuyen a la severidad de los síntomas de enfermedad se denominan factores de virulencia.

1.7. 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 determina el éxito o fracaso de la infección (Callow, 1987). Los patógenos deben detectar la proximidad de la planta y poner en marcha su maquinaria de ataque y la adaptación al interior de la misma. Por su parte, la planta reconoce la presencia del patógeno y desarrolla una respuesta de defensa para detener la invasión del mismo. La detección del patógeno es, por tanto, el primer paso para que la planta responda activando su defensa y evitando así la infección (Jones & Dangl, 2006).

En general, las especies vegetales no son hospedadoras para la mayoría de los microorganismos, por lo que se les considera resistentes a los mismos; ésta es la llamada resistencia general (non-host resistance). Esto se debe a que los microorganismos producen diversas moléculas que pueden ser potencialmente detectadas por las plantas, como es el caso de algunos polisacáridos o glicoproteínas presentes en las paredes fúngicas, que advierten a la planta de la presencia del patógeno (Pathogen Associated Molecular Patterns, PANMPs). Por otro lado, ciertos patógenos han desarrollado mecanismos para evitar ser reconocidos o para bloquear la respuesta de defensa de la planta. Por tanto, la planta se convierte 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, avirulentas o virulentas, y cultivares resistentes o sensibles.

En los años 50, se propuso la hipótesis denominada “gen por gen” (Flor, 1942, Flor, 1971) según la cual para cada gen de avirulencia (*avr*) del patógeno existe en la planta el correspondiente gen de resistencia (*R*). La pérdida o mutación de un gen *avr* conllevaría la desaparición de la resistencia mediada por el correspondiente gen *R* (Farman *et al.*, 2002).

La interacción entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y la planta de tomate se ajusta al anteriormente nombrado modelo “gen por gen”. En esta f. sp. se han definido tres razas

(Tabla 1), nombradas por orden de descubrimiento, que se distinguen por su respuesta frente a los genes de resistencia *I-1*, *I-2* e *I-3*. El gen *I-1* confiere resistencia contra la raza 1, el *I-2* contra la raza 2 y el *I-3* contra la raza 3. La raza 2 es virulenta en la línea *I-1* y la raza 3 lo es en las líneas *I-1* e *I-2*. Sin embargo, la raza 1 no se define en relación al gen *I-2* y puede ser dividida en grupos en función de su virulencia sobre esta línea (Mes *et al.*, 1999). Del mismo modo, las razas 1 y 2 no se definen en relación al gen *I-3* y entre los integrantes de estas pueden establecerse subgrupos en función de su virulencia en esta línea (Rep *et al.*, 2005).

Tabla 1 . Razas existentes en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Rep *et al.*, 2005).

Raza	Gen R en cultivares de tomate		
	<i>I-1</i>	<i>I-2</i>	<i>I-3</i>
1	No virulenta	Virulenta o no	Virulenta o no
2	Virulenta	No virulenta	Virulenta o no
3	Virulenta	Virulenta	No virulenta

F. oxysporum secreta una proteína, llamada Six1, durante la colonización del xilema que media la resistencia por el gen *I-3*. Las cepas afectadas en el gen *six1*, también llamado *avr3*, son virulentas en plantas *I-3*, mientras que las que lo expresan correctamente son avirulentas. Estos resultados indican que el reconocimiento y las plantas *I-3* hacia *F. oxysporum* está mediado por *six1* (Rep *et al.*, 2004).

Recientemente se ha identificado en *F. oxysporum* otro gen de avirulencia denominado *avr1* (Houterman *et al.*, 2008). El producto de este gen no sólo actúa como factor de avirulencia en plantas *I-1*, sino también como efector que suprime la resistencia en plantas *I-2* e *I-3*. Así, las cepas de *F. oxysporum* de las razas 2 y 3, por definición no patógenas en plantas *I-2* e *I-3* respectivamente, se vuelven más virulentas al expresar *avr1* (Houterman *et al.*, 2008).

1.8. Genes fúngicos esenciales para la patogénesis

En *Fusarium oxysporum*, al igual que en otros hongos patógenos, se han empleado dos tipos de aproximaciones para la identificación de genes esenciales en el proceso de patogénesis. La estrategia denominada genética inversa consiste en la anulación dirigida de genes candidatos que codifican proteínas implicadas en funciones biológicas conocidas y presumiblemente relevantes para el proceso de infección (Pietro *et al.*, 2003). Por otro lado, en la genética directa se buscan mutantes de patogenicidad obtenidos mediante inserción al azar de fragmentos de ADN y a continuación se identifican los genes afectados (Madrid *et al.*, 2003). Los procedimientos utilizados para la mutagénesis al azar por inserción son la integración de elementos genéticos móviles (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001, Lopez-Berges *et*

al., 2009), la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot *et al.*, 1998, Michielse *et al.*, 2009) y la integración de ADN transformante mediada por enzimas de restricción (Namiki *et al.*, 2001b, Imazaki *et al.*, 2007b)

En la siguiente tabla (Tabla 2) se resumen los genes caracterizados en *F. oxysporum* que han resultado esenciales o están implicados de alguna manera en la patogénesis. En muchos casos, los genes con un efecto significativo sobre la patogénesis han resultado ser los que regulan la expresión de un conjunto de otros genes. Entre ellos, se encuentran los que intervienen en la transducción de señales o los responsables de factores de transcripción.

Tabla 2 . Genes de *F. oxysporum* con fenotipo en la patogénesis vegetal.

Gen	Anotación	Virulencia en planta	Referencia
<i>abc3</i>	Trasportador de varias drogas	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2013)
<i>arg1</i>	Arginosuccinato liasa	Reducida	(Namiki <i>et al.</i> , 2001a)
<i>atg8</i>	Proteína quinasa	Reducida	(Corral-Ramos <i>et al.</i> , 2014) aceptado
<i>chs2</i>	Quitin sintasa 2	Reducida	(Martín-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008)
<i>chs7</i>	Chaperona de quitin sintasas	Reducida	(Martín-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008)
<i>chsV</i>	Quitin sintasa clase V	Avirulento	(Madrid <i>et al.</i> , 2003)
<i>chsV/ chsVb</i>	Quitin sintasa clase V/ Quitin sintasa clase VII	Avirulento	(Martín-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008)
<i>chsVb</i>	Quitin sintasa clase VII	Avirulento	(Martín-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008)
<i>clc1</i>	Canal de cloro dependiente de voltaje	Reducida	(Cañero & Roncero, 2008)
<i>cmlc</i>	Carboxi-cis, cis-muconato ciclasa	Avirulento	(Michielse <i>et al.</i> , 2012)
<i>ctf1 / ctf2</i>	Regulador de lipasa/ regulador de lipasas	Reducida	(Bravo-Ruiz <i>et al.</i> , 2013)
<i>Con7-1</i>	Factor de transcripción	Avirulento	(Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2014)
<i>cti6</i>	Factor de transcripción	Reducida	(Michielse & Rep, 2009)
<i>dcw1</i>	Proteína de la pared celular	Reducida	(Michielse & Rep, 2009)
<i>fbp1</i>	Proteína F-box	Reducida	(Miguel-Rojas & Hera, 2013)
<i>fga1</i>	Subunidad α de proteína G	Reducida	(Jain <i>et al.</i> , 2002)
<i>fga2</i>	Subunidad α de proteína G	Avirulento	(Jain <i>et al.</i> , 2005)
<i>fgb1</i>	Subunidad β de proteína G	Reducida	(Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005)
<i>fhk1</i>	Histidina quinasa	Reducido	(Rispaill & Di Pietro, 2010)
<i>fmk1</i>	MAP quinasa	Avirulento	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
<i>fmk1 / fgb1</i>	MAP quinasa/ Subunidad β de proteína G	Avirulento	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
<i>fmk1 / fhk1</i>	MAP quinasa/ histidina quinasa	Avirulento	(Rispaill & Di Pietro, 2010)
<i>fmk1 / fso1</i>	MAP quinasa/ proteína WW	Avirulento	(Rosales & Di Pietro, 2008)
<i>fmk1 / hog1</i>	MAP quinasa/MAP quinasa	Avirulento	Este estudio
<i>fmk1 / mpk1</i>	MAP quinasa/MAP quinasa	Avirulento	Turrá <i>et al</i> sin publicar
<i>fmk1 /</i>	MAP quinasa/mucina	Avirulento	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2011)

<i>msb2</i>	transmembrana		
<i>fnr1</i>	Factor de transcripción	Reducida	(Divon <i>et al.</i> , 2006)
<i>fow1</i>	Transportador mitocondrial	Reducida	(Inoue <i>et al.</i> , 2002)
<i>fow2</i>	Factor de transcripción	Avirulento	(Imazaki <i>et al.</i> , 2007a)
<i>frp1</i>	Proteína F-box	Avirulento	(Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2005)
<i>ftf1</i>	Factor de transcripción	Reducida	(Ramos <i>et al.</i> , 2007)
<i>gas1</i>	B-1,3-glucanosiltransferasa	Avirulento	(Caracuel <i>et al.</i> , 2005)
<i>gnt2</i>	N-acetilglucosamina transferasa	Reducida	(López-Fernández <i>et al.</i> , 2013)
<i>hapX</i>	Factor de transcripción regulador de la homeostasis del hierro	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
<i>hog1</i>	MAP quinasa	Reducido	Este estudio
<i>laeA</i>	Regulador de metabolitos secundarios	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
<i>meaB</i>	Factor de transcripción bZIP; Represor del catabolismo del nitrógeno	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2010)
<i>mepB</i>	Transportador de amonio	Reducida	Este estudio
<i>mpk1</i>	MAP quinasa	Reducida	Turrá <i>et al</i> sin publicar
<i>mpk1 / hog1</i>	MAP quinasa/MAP quinasa	Reducido	Este estudio
<i>msb2</i>	Mucina transmembrana	Reducida	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2011)
<i>pex12</i>	Peroxina	Reducida	(Michielse & Rep, 2009)
<i>pex26</i>	Peroxina	Reducida	(Michielse & Rep, 2009)
<i>rho1</i>	GTPasa tipo rho	Avirulento	(Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008)
<i>sge1</i>	Factor de transcripción	Avirulento	(Michielse & Rep, 2009)
<i>sho1</i>	Proteína transmembrana	Reducida	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2014)
<i>six1</i>	Proteína secretada	Reducida	(Rep <i>et al.</i> , 2005)
<i>snf1</i>	Proteína quinasa	Reducida	(Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 2003)
<i>ste12</i>	Factor de transcripción	Reducida	(Rispaill & Di Pietro, 2009)
<i>tom1</i>	Tomatina1	Reducida	(Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2008)
<i>veA</i>	Proteína reguladora	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
<i>velB</i>	Proteína reguladora	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)

1.9. *Fusarium oxysporum* como patógeno oportunista de mamíferos

Los hongos son una clase muy versátil de microorganismos compuesta principalmente de saprofitos que habitan en la materia orgánica muerta. Aproximadamente 10.000 especies de hongos infectan plantas (Agris, 1997), mientras que tan sólo unas 400 especies han sido descritas como patógenos de mamíferos (de Hoog *et al.*, 2000). Un número muy limitado de ellas pueden causar enfermedad en ambos tipos de hospedadores. Dentro de este último grupo se incluye a *F. oxysporum*. A parte de ser el causante de la marchitez vascular en más de un centenar de especies vegetales diferentes (Armstrong & Armstrong, 1981) y, recientemente, está considerado un patógeno oportunista humano capaz de producir infecciones que varían de lo superficial o localmente invasivo, hasta la fusariosis diseminada, dependiendo del estado inmunológico del individuo (Nucci & Anaissie, 2007).

Las infecciones fúngicas oportunistas están relacionadas con especies como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium marneffeii*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii* y determinados serotipos de *Cryptococcus neoformas*. Las infecciones humanas causadas por *Fusarium* están asociadas principalmente con dos complejos de especies: *F. solani* y *F. oxysporum*, y representan la segunda causa más importante de infecciones sistémicas provocadas por hongos filamentosos en pacientes inmunodeprimidos con resultado de muerte (Nucci & Anaissie, 2002, Zhang *et al.*, 2006a). Generalmente la inmunosupresión suele producirse debido a terapias relacionadas con el tratamiento del cáncer o trasplante de órganos y tejidos (Zhang *et al.*, 2006b).

1.10. *Fusarium oxysporum* como modelo de infección multihospedador

Debido a la capacidad de *F.oxysporum* para infectar tanto plantas como mamíferos se ha propuesto esta especie como modelo para la disección genética de la virulencia fúngica en ambos sistemas (Ortoneda *et al.*, 2004). De este primer trabajo se dedujo que la cepa 4287 de *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*, patógena del tomate, es capaz de matar ratones inmunodeprimidos. Estudios recientes han demostrado que las infecciones afectan a diversos órganos (Schäfer *et al.*, 2014b), y que el hongo es capaz de escapar de los macrófagos y de matarlos (Schäfer *et al.*, 2014a). Los análisis de genética inversa conducidos hasta ahora indican que la mayoría de factores de virulencia que son esenciales para la infección de plantas, no lo son para la infección de mamíferos y viceversa (Tabla 3). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la anulación simultánea de dos factores de virulencia, no esenciales por sí solos, pueden reducir la virulencia en ratones, como es el caso de los dobles mutantes $\Delta fmk1 \Delta fgb1$ que son incapaces de matar a ratones inmunodeprimidos (Prados-Rosales *et al.*, 2006). Estudios recientes demostraron que los genes *veA*, *laeA* y *hapX* son requeridos para la virulencia de *F. oxysporum* tanto en plantas de tomate como en ratones inmunodeprimidos (López-Berges *et al.*, 2012).

Tabla 3 . Genes de *F.oxysporum* afectados en patogénesis vegetal y animal.

Mutante	Virulencia en planta	Virulencia en ratón	Referencia
$\Delta abc3$	Reducida	Virulento	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta beas$	Reducida	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta chsV$	Avirulento	Virulento	(Madrid <i>et al.</i> , 2003, Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)
$\Delta fgb1$	Reducida	Avirulento	(Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005, Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2006)

$\Delta fmk1$	Avirulento	Virulento	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001, Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)
$\Delta fmk1$ $\Delta fgb1$	Avirulento	Avirulento	(Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005)
$\Delta fpr1$	Virulento	Reducida	(Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta gas1$	Reducida	Virulento	(Caracuel <i>et al.</i> , 2005)
$\Delta hapX$	Reducida	Avirulento	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta laeA$	Reducida	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta pacC$	Virulento	Reducida	(Caracuel <i>et al.</i> , 2003, Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)
$\Delta rho1$	Reducida	Virulento	(Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008)
ΔveA	Reducida	Reducida	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)
$\Delta wc1$	Virulento	Reducida	(Ruiz-Roldán <i>et al.</i> , 2008)

Por otra parte, los modelos de infección en mamíferos han sido de gran interés para comprender los mecanismos de virulencia de microorganismos patógenos (Pradel & Ewbank, 2004). El inconveniente de estos sistemas es que son costosos, consume mucho tiempo e implican importantes problemas de tipo ético y legal. Como alternativa, los modelos invertebrados pueden proporcionar datos sobre la infección sin la necesidad de utilizar mamíferos para ensayos *in vivo*. Los modelos invertebrados como las larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* son éticamente convenientes, relativamente simples y de bajo coste, pudiéndose utilizar tanto para estudios del proceso infeccioso *in vivo*, como las respuestas del hospedador. Recientemente se ha descrito que la cepa silvestre de *F. oxysporum* es capaz de infectar a *G. mellonella* al ser inyectado en el hemocelo (Navarro-Velasco *et al.*, 2011). Además, hay una perfecta correlación entre el sistema de infección de ratones y la larva, ya que todos los mutantes ensayados presentan el mismo fenotipo que en la infección de ratones inmunodeprimidos. El sistema de *G. mellonella* proporciona una versatilidad elevada, ya que las larvas son susceptibles a una infección local, además de una inoculación sistémica. Hay que destacar que este sistema modelo no requiere la infraestructura necesaria para *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*. Además, *G. mellonella*, puede mantenerse bajo variadas condiciones de temperatura en un rango desde los 25 °C a 37°C (Mylonakis, 2008). Además la inoculación por inyección proporciona una cantidad exacta de células fúngicas, lo cual supone una ventaja frente al método de alimentación para la inoculación, usado en la mayoría de los otros hospedadores no mamíferos (Burgwyn-Fuchs & Mylonakis, 2006). Sin embargo, *G. mellonella* no tiene los beneficios clásicos de un hospedador modelo (el genoma secuenciado).

2. Cascadas de transducción de señales

Los hongos son capaces de percibir y responder a los cambios en el medio ambiente. Las vías de transducción de señales juegan un papel muy importante en la percepción de estos cambios y la posterior activación de la maquinaria intracelular encargada de la respuesta adaptativa. Normalmente, la transducción de señales implica la unión de un ligando a un receptor permitiendo un cambio conformacional en éste y la posterior activación de uno o varios componentes aguas abajo en la cascada. Finalmente se producirán cambios en el patrón de expresión de genes, alterándose así el comportamiento celular para dar una respuesta adecuada.

En eucariotas, la familia de proteínas quinasas del tipo serina/treonina, conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK del inglés, mitogen-activated protein kinases), funcionan en amplificación de una gran cantidad de señales extracelulares y en la regulación del desarrollo y de respuestas a estrés (Widmann *et al.*, 1999). Las vías MAPK están constituidas por un módulo muy conservado de tres proteínas quinasas: La MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), la MAP quinasa quinasa (MAPKK) y la MAP quinasa (MAPK) que, secuencialmente y en ese orden, se activan unas a otras mediante fosforilación de residuos serina/treonina (Figura 4). Las señales que activan estas son detectadas por receptores específicos desencadenando con ello la transducción de la señal bien de forma directa o bien a través de otros componentes intermediarios. Las MAPKs están altamente conservadas a lo largo de la evolución, fosforilan un grupo de sustratos muy amplio, entre los que se encuentran factores de transcripción, proteínas quinasas activadas por MAP quinasas, fosfatasa y muchas otras proteínas relacionadas con el metabolismo celular, morfología celular, progresión del ciclo celular y expresión génica en respuesta a una gran variedad de estreses extracelulares (Qi & Elion, 2005).

2.1. Rutas MAPK en *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las cascadas MAPKs constituyen un mecanismo de señalización esencial para la función celular (Chen & Thorner, 2007). Estos grandes módulos proteicos, así como sus componentes aguas arriba y abajo, están altamente conservados incluso en hongos muy alejados filogenéticamente como son los hongos fitopatógenos (Rispaill *et al.*, 2009).

En *S. cerevisiae*, cuatro principales rutas MAPK regulan el crecimiento celular y la morfogénesis en respuesta a diferentes estímulos medioambientales (Figura 4): Fus3, que controla la respuesta a feromonas de apareamiento sexual, Kss1 que regula el crecimiento invasivo y filamentoso, Slt2/Mpk1 que controla el remodelado de la pared celular en

respuesta a estrés hiposmótico, y Hog1 que es requerido para la adaptación a estrés hiperosmótico (Qi & Elion, 2005). Algunas revisiones recientes proporcionan una visión muy amplia a cerca de las rutas de señalización por MAPKs en levaduras y en otros hongos (Chen & Thorner, 2007, Hamel *et al.*, 2012, Turrà *et al.*, 2014).

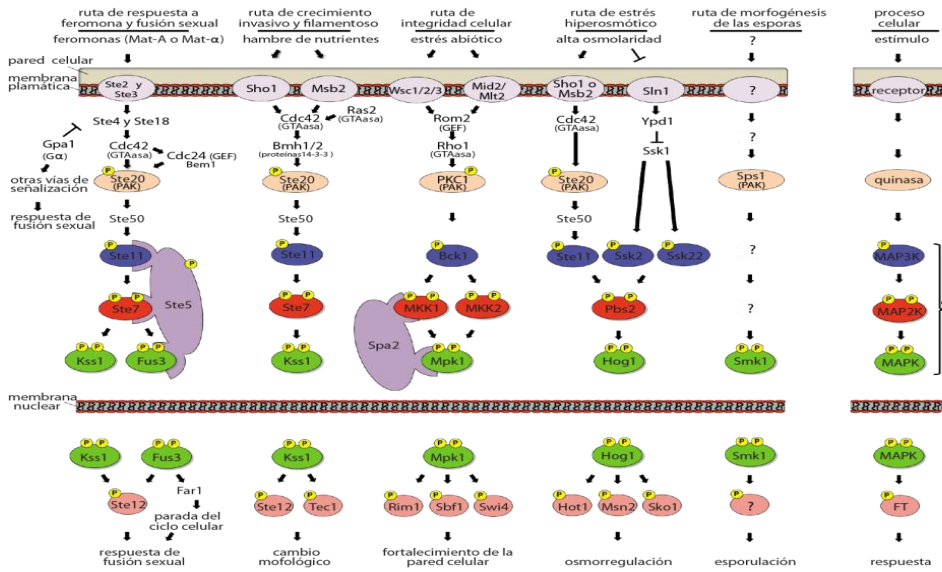


Figura 4. Rutas MAPKs en *Saccharomyces cerevisiae*. Ver texto para conocer los de cada ruta. Adaptado de (Hamel *et al.*, 2012).

2.1.1. Ruta de respuesta a feromona

En *S. cerevisiae* existen dos tipos de células haploides, MATα y MATa que pueden unirse para formar la célula diploide MATα/MATa. La ruta de respuesta a feromona ha sido caracterizada en detalle (Elion, 2000, Gustin *et al.*, 1998, Kurjan, 1993, Wang & Dohlman, 2004). La cascada de señalización comienza cuando la feromona es secretada por las células haploides y se une a unos receptores acoplados a proteínas G (Ste2 y Ste3) (Figura 4). Esta unión provoca una disociación de la subunidad inhibitoria Gα (Gpa1) de las subunidades activadoras Gβ y Gγ (Ste4 y Ste18, respectivamente) (Klein *et al.*, 2000). La disociación de las subunidades Gβγ permite su interacción con la proteína de andamiaje Ste5 (que sirve de anclaje para las MAPKs Ste11, Ste7 y Fus3) y la proteína quinasa ste20 para formar un complejo multiproteico que finalmente activará la MAPKKK ste11 (Chol *et al.*, 1994, Marcus *et al.*, 1994, Printen & Sprague, 1994). Ste11 es el punto de entrada en la cascada MAPK que incluye a Ste7 como MAPKK y, finalmente, a dos MAPKs parcialmente redundantes, Fus3 y Kss1 (Gagiano *et al.*, 2002, Ma *et al.*, 1995). Mientras que Fus3 es esencial para la fusión sexual, Kss1 controla el crecimiento invasivo y el desarrollo pseudohifal (Madhani & Fink, 1997). Ste12 y Far1 son las dianas primarias de la vía de

respuesta a feromona. Far1 interviene en la parada del ciclo celular en la fase G1, ya que inhibe la formación del complejo de la quinasa dependiente de ciclina (CDK, del inglés *cyclin-dependent kinase*) con la ciclinas Cln1/2/3, impidiendo con ello el paso a la fase S (Tyers & Futcher, 1993) (Figura 5). Sin embargo, hay quien defiende que la inhibición ocurre a través del sitio catalítico del complejo CDK/Cln y no a través de la formación (Peter & Herskowitz, 1994) (Gartner *et al.*, 1998). Además, Far1 determina la dirección del crecimiento polarizado durante la fusión sexual (Butty *et al.*, 1998, Peter *et al.*, 1993). Por su parte, Ste12 es un factor de transcripción clave que, junto con Tec1, regula a genes implicados en el crecimiento invasivo (Madhani & Fink, 1997) (Figura 4).

2.1.2. Ruta de crecimiento filamentoso

Las células de *S. cerevisiae* tienen un crecimiento esférico u ovoide y se reproducen mitóticamente por gemación en condiciones de altas concentraciones de nutrientes. Cuando las concentraciones de nutrientes son limitantes, las células crecen alteran su crecimiento produciendo unas células delgadas y elongadas cuyas células hijas no se separan, quedando adheridas unas a otras adoptando forma de filamento. Este comportamiento se conoce con el nombre de crecimiento filamentoso (FG: del inglés *filamentous growth*) (Cullen *et al.*, 2000, Gimeno *et al.*, 1992, Roberts & Fink, 1994). En células haploides, esta respuesta, se activa cuando la concentración de glucosa es limitante, mientras que en células diploides, se induce cuando las concentraciones de nitrógeno son bajas. Algunos de los fenotipos asociados al crecimiento filamentoso son el retraso de la fase G2 en el ciclo celular, reorganización de la polaridad celular y cambios en la unión célula-célula y célula-sustrato (Kron *et al.*, 1994, Rua *et al.*, 2001, Verstrepen & Klis, 2006) Estos cambios están correlacionados con varias rutas de señalización incluyendo la ruta de proteína quinasa A mediada por AMP cíclico (PKA, del inglés *protein kinase A*) (Mösch *et al.*, 1999, Mösch *et al.*, 1996), el complejo de señalización TOR (Del inglés, *target of rapamycin*) (Rohde & Cardenas, 2004, Vinod *et al.*, 2008) y la MAPK Kss1 (Borneman *et al.*, 2007, Roberts & Fink, 1994).

La MAPK que controla el crecimiento filamentoso, Kss1, comparte varios componentes con la ruta de respuesta a feromona, como Ste20, Ste50, Ste7 y Ste11 (Figura 4). Los receptores de esta ruta son dos proteínas de membrana llamadas Msb2 y Sho1 (O'Rourke & Herskowitz, 2002). Cuando las concentraciones de nutrientes son limitantes, Msb2 interacciona con Sho1 y se recluta en la membrana plasmática a la proteína Cdc42 (Cullen *et al.*, 2004) que servirá de anclaje para Ste50. Ste50, a su vez, interacciona con Cla4 y Ste20, que al igual que en la ruta de respuesta a feromona, activa al módulo de esta ruta MAPK Ste11/Ste7/Kss1. Cuando la cantidad de nutrientes es óptima, Kss1 permanece inactiva en el núcleo secuestrando a los factores de transcripción Ste12 y Tec1, (Madhani & Fink, 1997),

mientras que cuando Kss1 está fosforilada deja de actuar como regulador negativo, permitiendo la expresión de estos factores de transcripción (Figura 4).

Además de la ruta MAPK, el crecimiento invasivo está regulado por otras rutas de proteína quinasa. La ruta de señalización PKA se activa cuando la proteína Ras2 activa a la adenilato ciclasa (AC), que degrada el ATP a AMPc, incrementando así los niveles de AMPc intracelular (Gancedo, 2001). El AMPc se une a la subunidad reguladora de la PKA, ello activa la subunidad catalítica que, a su vez, activa al factor de transcripción Flo8. Este factor de transcripción activa, la expresión de una glicoproteína de membrana relacionada con la unión célula-célula, célula-sustrato (Flo11), obteniéndose así el crecimiento filamentosos. Otra ruta que activa el crecimiento filamentosos es la de la proteína quinasa Snf1, que es necesaria para la transcripción de genes reprimidos por glucosa (Hardie *et al.*, 1998, Sanz, 2003). Además Snf1 contribuye al crecimiento invasivo en células haploides ya que promueve la expresión de Flo11 en respuesta a niveles bajos de glucosa. Hay evidencias que apuntan que la proteína quinasa TOR podría participar en la regulación de Snf1 produciéndose una respuesta de crecimiento pseudohifal en condiciones limitantes de nitrógeno (Orlova *et al.*, 2006) (Figura 6).

2.1.3. Ruta de integridad de la pared celular

La cascada de la integridad de la pared celular controlada por la MAPK Slit2/Mpk1 es la principal responsable de cambios en la pared durante el ciclo celular y además está involucrada en respuesta a varios tipos de estreses como la alta temperatura y la exposición a metales pesados (Levin, 2005). Algunos genes que se encuentran bajo el control de esta ruta están implicados en la síntesis y modificación de componentes de la pared celular como los glucanos, la manosa o la quitina (García *et al.*, 2004, Lesage & Bussey, 2006).

La ruta está constituida por la MAPKKK Bck1; por dos MAPKKs redundantes (Mkk1 y Mkk2) así como por la MAPK Slit2/mpk1. Cinco proteínas de membrana, Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1, cada uno con un único dominio transmembrana, son las responsables de iniciar la vía, aunque no se conocen todavía las señales concretas que las activan. Estas proteínas se encargan de transmitir la información a Rom2 (Philip & Levin, 2001), un factor intercambiador de guanina que regula la actividad de la GTPasa Rho1 (Ozaki *et al.*, 1996). Rho1 en estado activo se encargará de activar a la proteína quinasa C (PCK1), que a su vez fosforila a Bck1 (Levin, 2005), iniciando así la cascada de señalización mediada por Slit2/Mpk1. La activación de Slit2/Mpk1 lleva a la fosforilación de múltiples factores de transcripción relacionados con diversos procesos (Figura 4). Por un lado, los factores de transcripción Swi4/6 y Mbp1 (Nasmyth & Dirick, 1991) regulan la parada del ciclo celular en la fase G2 (Baetz *et al.*, 2001, Madden *et al.*, 1997). Slit2/Mpk1 promueve la eliminación de la

fosfatasa y la estabilización del Swe1, ambos necesarios para promover el retraso de la fase G2 (McMillan *et al.*, 1999) (Figura 5). Por otro lado, Stt2/Mpk1 activa al factor de transcripción Rlm1 que está relacionado con la activación de unos 25 genes, todos ellos implicados en la síntesis de la pared celular (Jung *et al.*, 2002) (Figura 4).

2.1.4. Ruta en respuesta a estrés osmótico mediada por Hog1

La activación de la cascada de señalización mediada por la MAPK Hog1 (HOG, del inglés *high osmolarity glicerol*) ocurre en respuesta a estrés hiperosmótico (Hohmann *et al.*, 2007, O'Rourke & Herskowitz, 2002). Hog1 es fosforilado por la MAPKK Pbs2, que, a su vez, puede ser fosforilada por dos MAPKKK diferentes (Ssk2/22 y Ste11) dependiendo de la intensidad de la señal. En condiciones hiperosmóticas extremas, el receptor de tipo histidina quinasa Sln1 activa la ruta Ypd1/Ssk1/Ssk2-22, (Posas *et al.*, 1996). En condiciones hiperosmóticas moderadas, Sho1 es el encargado de transmitir la señal a través de la cascada Ste20/Ste11 (Figura 4) (Posas & Saito, 1997).

La fosforilación de Hog1 conlleva su translocación y al núcleo, donde activa a varios factores de transcripción como Msn2/4 y Mcm1 (de Nadal *et al.*, 2002), todos ellos relacionados con la expresión de genes requeridos para la supervivencia en condiciones de estrés osmótico (Figura 4). Al igual que la ruta en respuesta a feromona, la ruta HOG también está relacionada con la parada del ciclo celular (Clotet *et al.*, 2006, Escoté *et al.*, 2004, Zapater *et al.*, 2004). Al contrario de Fus3, que detiene sólo la fase G2, Hog1 detiene el ciclo celular tanto en G1 como en G2 (Alexander *et al.*, 2001, Zapater *et al.*, 2004). La parada en G1 está determinada principalmente por la fosforilación y consiguiente estabilización del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (Sic1) en respuesta a estrés osmótico o al arsénico (Escoté *et al.*, 2004, Migdal *et al.*, 2008) (Figura 5). Otro tipo de parada del ciclo regulada por Hog1, esta vez sólo en respuesta a estrés osmótico, ocurre entre la fase G2 y la entrada en mitosis. Hog1 induce un retraso de la división celular estabilizando a Swe1 (Clotet *et al.*, 2006), una proteína quinasa que es degradada para que se forme el complejo CDK-ciclina y arranque la mitosis. En ausencia de estrés, el paso de la fase G2 a mitosis tiene un punto de control morfogénico, en el que se ensambla un anillo donde se producirá la gemación. En este anillo se recluta la proteína quinasa dependiente de AMP Hsl1 que fosforila a otra proteína llamada Hsl7. La acción combinada de ambas proteínas provoca la degradación de Swe1 por parte del proteosoma y, con ello, la entrada en mitosis (McMillan *et al.*, 1999, Shulewitz *et al.*, 1999). Hog1 fosforila a Hsl1 en el dominio de interacción Hsl7, llevándose a su disociación y a la estabilización de Swe1 y produciéndose la parada en G2 (Clotet *et al.*, 2006) (Figura 5).

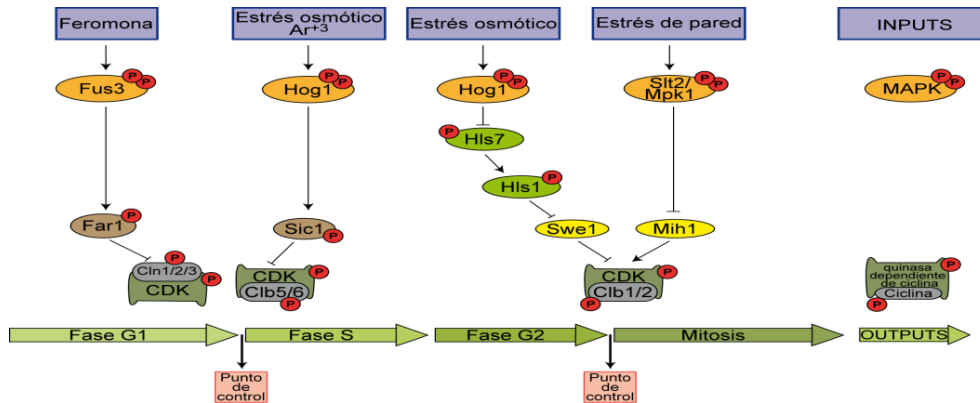


Figura 5. Regulación del ciclo celular a través de las rutas MAPK en *Saccharomyces cerevisiae*. Ver texto para más información. Adaptada de (Correia et al., 2010).

2.2. Rutas MAPKs en hongos patógenos

Los hongos patógenos de plantas han desarrollado estrategias para reconocer el hospedador adecuado, penetrar e invadir el tejido vegetal, superar las defensas de la planta y, finalmente, optimizar su crecimiento en su interior. Para llevar a cabo estas funciones, los hongos deben de ser capaces de percibir las señales físico-químicas del hospedador y responder con los cambios metabólicos y morfológicos adecuados, como por ejemplo, la adhesión a la superficie de la planta, diferenciación de estructuras especializadas de infección, secreción de fitotoxinas y enzimas líticas (Knogge, 1996). Muchas de estas respuestas requieren la síntesis de productos génicos específicos que dependen de rutas de señalización muy conservadas como por ejemplo, la activación de proteínas G (Bölker, 1998), la señalización a través de la proteína quinasa A (PKA) (Lee & Dean, 1993, Mitchell & Dean, 1995) y las cascadas de señalización MAPK (Xu & Hamer, 1996, Xu *et al.*, 1998).

En los siguientes apartados, resumiremos los principales estudios en los que las rutas MAPK han resultado de interés para comprender el mecanismo de infección en hongos patógenos de plantas y humanos.

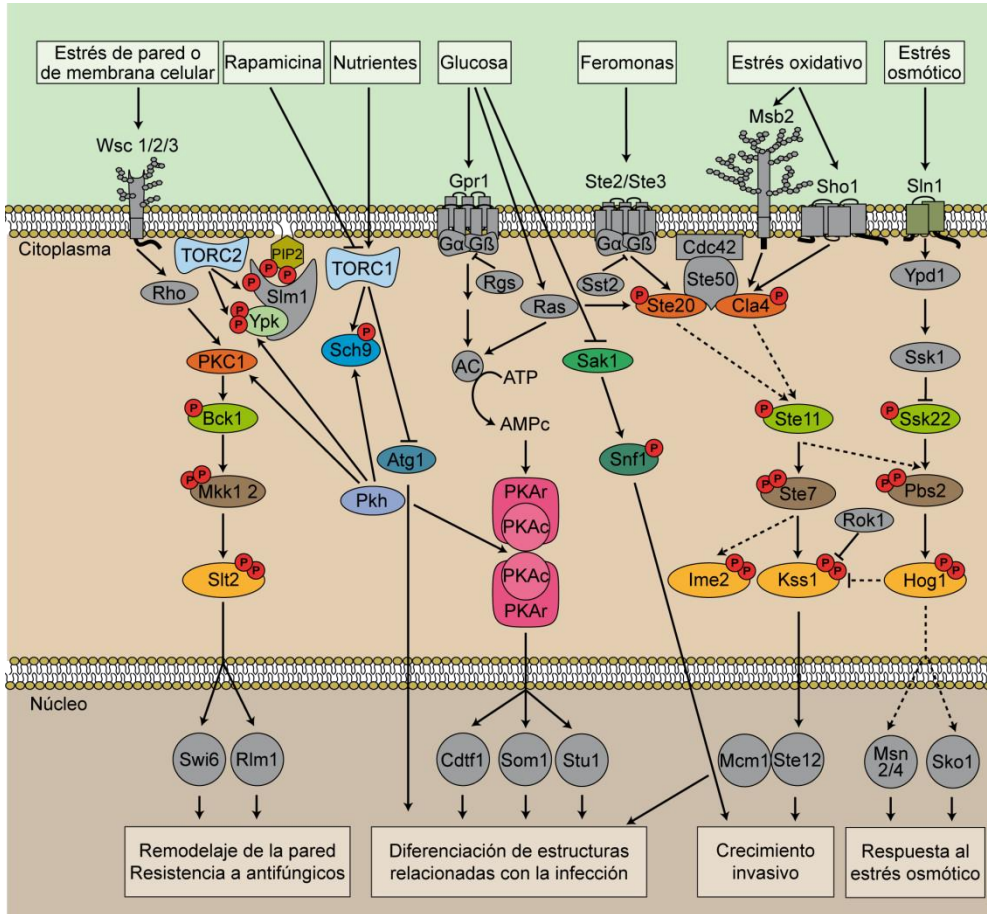


Figura 6. Cascadas MAPK en hongos patógenos. ver texto para los detalles de cada ruta. Adaptada de (Turrà *et al.*, 2014).

2.2.1. Homólogos de la ruta Fus3/Kss1

En la década de los 90 comenzaron a caracterizarse las diferentes rutas MAPK en hongos patógenos de plantas y humanos, lográndose relacionar estas rutas con la virulencia los cambios morfogénéticos durante la infección. En la mayoría de las especies, las rutas conservan un estructura y organización similares, sin embargo, existen algunas diferencias que reflejan la especialización que la ruta ha sufrido y su influencia en la virulencia (Rispaill *et al.*, 2009).

La mayoría de los hongos filamentosos tienen sólo una única MAPK homóloga a Fus3 y Kss1. (Xu & Hamer, 1996) fueron los primeros en caracterizar una MAPK homóloga a Fus3 de *S. cerevisiae* en el patógeno del arroz *Magnaporthe oryzae*. Esta MAPK resultó ser esencial para la virulencia y se denominó Pmk1 (del inglés, pathogenenicity MAP kinase). En la actualidad se han analizado más de 50 MAPKs ortólogas a Pmk1 en un amplio y diverso

grupo de patógenos e plantas, y en todos los casos han resultado ser esenciales, principalmente en los primeros estadios de la infección (Di Pietro *et al.*, 2001, Jenczmionka *et al.*, 2003, Lev & Horwitz, 2003, Lev *et al.*, 1999, Mey *et al.*, 2002a, Ruiz-Roldán *et al.*, 2001, Takano *et al.*, 2000, Zheng *et al.*, 2000). Por ejemplo, los mutantes de *M. oryzae*, *Colletotrichum lagenarium*, *Cochliobolus heterostrophus* y *Pyrenophora teres* en genes ortólogos a *fus3/Kss1*, no son capaces de formar apresorios. Por otro lado, estos mutantes, tampoco crecen en el interior de la planta cuando son inoculados en heridas, sugiriendo que esta MAPK regula otras funciones relacionadas con la virulencia además de la formación del apresorio. En apoyo a esta teoría los patógenos que no forman apresorio para infectar al huésped, como *F. oxysporum*, también requieren al ortólogo de Pmk1 para infectar (Di Pietro *et al.*, 2001). En *M. oryzae*, los componentes que regulan la ruta incluyen la MAPKKK Mst11, la MAPKK Mst7 y el homólogo de Ste50, Mst50. Mst50 es esencial para la formación de apresorio y la patogenicidad (Zhao *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2006), sin embargo Mst20 (homólogo de Ste20) no es necesario para la activación de Pmk1 y para la virulencia, hecho que sugiere que la activación de esta ruta difiere entre levaduras y hongos filamentosos (Li *et al.*, 2004). Mutantes en *mgcdc42*, ortólogo de *cdc42* de *Saccharomyces*, aún son capaces de desarrollar apresorios aunque no son funcionales, ya que los mutantes no son capaces de generar turgencia y acumular superóxidos, por lo que no pueden penetrar al interior del huésped (Zheng *et al.*, 2009). El principal factor de transcripción regulado Pmk1 en *M. oryzae* es Mst12, ortólogo de Ste12 en levaduras, que, aunque no es esencial para el desarrollo del apresorio, si lo es necesario para la virulencia (Park *et al.*, 2004a).

En *Ustilago maydis*, hongo patógeno del maíz que infecta mediante la formación de apresorio, hay descritas dos MAPKs homólogas a Fus3 y Kss1, Kpp2 y Kpp6. Ambas tienen funciones en la fusión sexual y en la infección de la planta. Kpp2 está relacionada con los primeros pasos de la formación del apresorio (Müller *et al.*, 2003) mientras que Kpp6 realiza pasos más tardíos de madurez del apresorio (Brachmann *et al.*, 2003). Ubc2, Kpp4/Ubc4 y Fuz7, ortólogos de Ste50, Ste11 y Ste7 respectivamente, están implicados en la respuesta a feromona y en virulencia (Mayorga & Gold, 2001). Al igual que sucede en *M. oryzae*, Smu1, el ortólogo de Ste20, no está relacionado con la activación de la cascada Kpp4/Fuz7/Kpp2-Kpp6 y no es necesario para la fusión sexual o la infección de la planta (Smith *et al.*, 2004).

Mutaciones en ortólogos de Fus3/Kss1 en otros hongos patógenos de plantas que no forman apresorios, como *F. graminearum*, *F. oxysporum* o el hongo patogénico necrófito *Botrytis cinérea* también anulan la capacidad de infectar al huésped (Di Pietro *et al.*, 2001, Jenczmionka *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2000). Los mutantes de *C. heterostrophus* y *C. lagenarium*, muestran defectos en la conidiación (Lev *et al.*, 1999, Takano *et al.*, 2000), mientras que los de *B. cinérea* tienen el crecimiento vegetativo reducido.

El hongo patógeno de humanos *Candida albicans* tiene dos ortólogos Fus3/Kss1, Cek1 y Cek2, respectivamente. Cek1 regula la fusión de hifas y la fusión sexual (Monge *et al.*, 2006, Bennett & Johnson, 2005, Csank *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2002) Cek2 es redundante a Cek1 pero sólo en la fusión sexual (Chen *et al.*, 2002). Deleciones de otros componentes de la ruta Cek1, como Hst7 (ortólogo de Ste7), Ste20 los factores de transcripción Cph1 y Tec1 (ortólogos de Ste12 y Tec1, respectivamente) también afectan a la virulencia y a la formación de hifas (Köhler & Fink, 1996, Leberer *et al.*, 1996).

La proteína de unión a GTP Ras juega un importante papel en la virulencia de muchos hongos patógenos. En *C. albicans*, Ras es el nexo de unión entre la morfogénesis celular y la virulencia mediante la regulación de las ruta MAPK y la de la proteína quinasa dependiente de AMPc (Leberer *et al.*, 2001). En *U. maydis*, la expresión de un alelo dominante activo de *ras2* promueve el crecimiento pseudohifal de manera dependiente a la ruta de señalización MAPK mediada por feromona. Del mismo modo, en *M. oryzae* la expresión de un alelo dominante de *ras2*, estimula la formación de apresorios en superficies normalmente no inductoras en un fondo silvestre, pero no en un mutante *pmk1*, sugiriendo que Ras2 contribuye a la activación de la ruta Mst11/Mst7/Pmk1 (Park *et al.*, 2006). En *F. graminearum*, Ras2 juega un papel similar a *M. oryzae* (Bluhm *et al.*, 2007).

La Tabla 4 resume las principales funciones de los homólogos de Fus3/Kss1 en los distintos hongos patógenos.

Tabla 4 . Homólogos de Fus3/Kss1 caracterizados en hongos fitopatógenos. Adaptada de (Zhao *et al.*, 2007)

Organismo	MAPK	Función principal	Referencia
<i>M. oryzae</i>	Pmk1	Formación de apresorios, patogenicidad y crecimiento infeccioso	(Xu & Hamer, 1996)
<i>C. lagenarium</i>	Cmk1	Formación de apresorios, patogenicidad y germinación de esporas	(Takano <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. teres</i>	Ptk1	Formación de apresorios, patogenicidad y conidiación	(Ruiz-Roldán <i>et al.</i> , 2001)
<i>C. heterostrophus</i>	Chk1	Formación de apresorios, virulencia y conidion	(Lev <i>et al.</i> , 1999)
<i>F. oxysporum</i>	Fmk1	Patogenicidad, crecimiento infeccioso y adhesión a la raíz	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. cinerea</i>	Bmp1	Patogenicidad y crecimiento	(Zheng <i>et al.</i> , 2000)
<i>U. maydis</i>	Kpp2	Desarrollo de apresorios y fusión sexual	(Müller <i>et al.</i> , 2003)
<i>U. maydis</i>	Kpp6	Penetración del apresorio y fusión sexual	(Brachmann <i>et al.</i> , 2003)

<i>F. graminearum</i>	Gpmk1	Patogenicidad, crecimiento infeccioso y conidiación	(Jenczmionka <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. albicans</i>	Cek1	Virulencia, crecimiento infeccioso y formación de hifas	(Monge <i>et al.</i> , 2006, Bennett & Johnson, 2005, Csank <i>et al.</i> , 1998, Chen <i>et al.</i> , 2002)
<i>C. albicans</i>	Cek2	Fusión celular	(Chen <i>et al.</i> , 2002)

2.2.2. Homólogos de la ruta de Slit2/Mpk1

Mutantes del homólogo de la MAPK Slit2/mpk1 de levaduras se han generado en muchos hongos filamentosos (Bussink & Osmani, 1999, Kojima *et al.*, 2002, Mey *et al.*, 2002a, Xu *et al.*, 1998). Esta MAPK es importante para la patogenicidad y para la remodelación de la pared. En *M. oryzae*, el homólogo de Slit2/Mpk1, Mps1 es esencial para la conidiación, penetración a través del apresorio y la infección de la planta (Xu *et al.*, 1998). Al igual que los mutantes *slt2/mpk1* de *Saccharomyces*, los de *M.* o muestran mayor sensibilidad a enzimas que degradan la pared celular, pero además tienen otros fenotipos como la reducción de la esporulación y de la fertilidad (Xu *et al.*, 1998). En *F. graminearum*, dicha MAPK es necesaria para la fusión de hifas, la regeneración de la pared celular y para la patogenicidad (Hou *et al.*, 2002). En *C. lagenarium*, es requerida en los primeros estadios de la formación del apresorio. En *Claviceps purpurea* y *B. cinerea*, se requiere para la penetración en el huésped y para la regeneración de la pared celular (Mey *et al.*, 2002a). El ortólogo en *Aspergillus fumigatus* controla la respuesta al estrés de la pared y oxidativo, pero no es necesario para la virulencia en un sistema animal (Valiante *et al.*, 2008). En *A. nidulans*, MpkA juega un importante papel en la germinación de esporas y en el crecimiento de apical de la hifa (Bussink & Osmani, 1999). En *C. albicans*, el ortólogo a Slit2/Mpk1 Mck1 es necesario para el crecimiento a altas temperaturas y para el remodelado de la pared celular en respuesta a muchos tipos de estreses como antifúngicos, cafeína, estrés oxidativo y osmótico y choque de frío (Diez-Orejas *et al.*, 1997). La fosforilación de Mck1 en respuesta a estrés oxidativo depende parcialmente de la ruta CaHog1, sugiriendo un punto de conexión entre ambas rutas (Arana *et al.*, 2005). Mck1 ha sido relacionada con la transición morfogénica y la patogénesis en *C. albicans* (Diez-Orejas *et al.*, 1997). Mck1, además, se fosforila en respuesta al contacto físico con una superficie, regulando así el crecimiento invasivo en agar y la formación de biofilm (Kumamoto, 2005).

Algunos de los componentes que activan la ruta han sido estudiados en hongos filamentosos. En *C. albicans*, Rho1 es esencial para la viabilidad de la célula, al igual que en *S. cerevisiae* (Smith *et al.*, 2002). Por el contrario, los mutantes de *rho1* de *F. oxysporum* son viables, aunque muestran una drástica reducción en el crecimiento de hifas en medio sólido y

en la virulencia en plantas de tomate, aunque siguen siendo virulentos en ratones inmunodeprimidos (Martínez-Rocha *et al.*, 2008).

2.2.3. Homólogos de la ruta Hog1

El papel de ha sido muy estudiado en muchos hongos patógenos. Mientras que la principal función de Hog1 en *S. cerevisiae* es la osmoregulación, sus homólogos en patógenos regulan la virulencia y las respuestas a múltiples estreses.

Mutantes de *M. oryzae* en el ortólogo de *hog1*, *osm1*, son sensibles a estrés osmótico, pero aun forman un apesorio funcional y son virulentos en plantas de arroz (Dixon *et al.*, 1999). En *F. graminearum*, mutantes nulos en la MAPKKK FgOs4, la MAPKK FgOs5 y la MAPK FgOs2 tienen una mayor pigmentación en hifas aéreas, aunque su papel en la virulencia queda por determinar (Ochiai *et al.*, 2007). La delección de *hog1* en *C. parasitica* y *C. lagenarium* también los hace sensibles a estrés osmótico (Kojima *et al.*, 2002, Moriwaki *et al.*, 2006).

En *C. albicans*, la ruta Hog1 regula la adaptación a estrés osmótico y oxidativo, además, es necesaria en virulencia y en la morfogénesis de las hifas (Alonso-Monge *et al.*, 2003, Monge *et al.*, 2006, Enjalbert *et al.*, 2006). Al igual que sucede en levaduras, Sln1, Ssk1 y Sho1 están relacionados con la adaptación al estrés oxidativo (Calera *et al.*, 2000, Chauhan *et al.*, 2003). Sin embargo el principal componente requerido para la activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo es CaSsk1, que no es necesario para la respuesta a estrés osmótico (Chauhan *et al.*, 2003, Cheetham *et al.*, 2007). Mutantes en CaSsk1 son avirulentos y no pueden adherirse a células humanas (Calera *et al.*, 2000). La histidina quinasa CaSln1 está relacionada con la formación de hifas y la virulencia (Nagahashi *et al.*, 1998). Sorprendentemente, los receptores Sho1 y Msb2 en *C. albicans* contribuyen a la respuesta a estrés osmótico aunque de manera independiente a Hog1, ya que el triple mutante $\Delta sho1\Delta msb2\Delta ssk1$ es sensible a estrés osmótico pero no está afectado en la activación de Hog1 ni en su translocación al núcleo (Alonso-Monge *et al.*, 1999, Eisman *et al.*, 2006, Román *et al.*, 2009).

En el patógeno de humanos *A. fumigatus*, dos ortólogos de Hog1, SakA y MpkC juegan distintos papeles en la respuesta a estrés oxidativo y nutricional, aunque no son importantes para la virulencia (Reyes *et al.*, 2006, Xue *et al.*, 2004). Delecciones en el ortólogo de la histidina quinasa Sln1, Tbs2, no produce un fenotipo claro (Du *et al.*, 2006). Sho1 regula el crecimiento y la morfología de las hifas y la respuesta a estrés oxidativo (Ma *et al.*, 2008), pero es prescindible para la virulencia.

2.3. Ruta MAPK de la patogenicidad en *F. oxysporum* (Fmk1)

En *F. oxysporum*, el gen *fmk1* codifica para una MAPK que controla la formación de hifas especializadas en la infección, la adhesión a la raíz, la penetración y el crecimiento invasivo en la planta (Di Pietro *et al.*, 2001, Prados-Rosales & Di Pietro, 2008). La proteína Fmk1 comparte un 90% de identidad con las MAPKs ortólogas de patógenos que infectan las partes aéreas de las plantas como *M. oryzae*, *C. lagenarium* y *C. heterostropus* (Di Pietro *et al.*, 2001, Lev *et al.*, 1999, Takano *et al.*, 2000, Xu & Hamer, 1996). Los mutantes en el gen *fmk1* muestran un crecimiento normal en medio de cultivo (Figura 7) pero no pueden infectar plantas de tomate (Figura 7), aun siendo virulentos en ratones inmunodeprimidos (Ortoneda *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que Fmk1 participa en los primeros estadios de la infección controlando la morfogénesis hifas relacionadas con la adhesión a la raíz (Di Pietro *et al.*, 2001). Como se describe se ha descrito anteriormente durante los primeros pasos de la infección las esporas germinan en respuesta a estímulos presentes en el exudado de la raíz, las hifas se adhieren a la raíz y penetran en ella (Mendgen *et al.*, 1996, Perez-Nadales & Di Pietro, 2011) (Figura 3). Aunque Fmk1 no es necesario para la germinación, sí lo es necesario para la adherencia a la raíz y la diferenciación de las hifas de penetración (Di Pietro *et al.*, 2001, Perez-Nadales & Di Pietro, 2011) se ha descrito que el gen ortólogo de *M. oryzae*, Pmk1, es capaz de complementar la mayoría de los fenotipos del mutante *fmk1*. Esto sugiere la conservación de la ruta MAPK a pesar de que estos hongos no compartan el mismo mecanismo de infección (*F. oxysporum* no desarrolla apresorio) (Di Pietro *et al.*, 2001).

Otro fenotipo característico de los mutantes en esta MAPK en hongos patógenos es que no son capaces de colonizar el tejido vivo de la planta (Takano *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 1999, Zheng *et al.*, 2000). El mutante *fmk1* de *F. oxysporum* tampoco puede crecer en frutos de tomate, al contrario de la cepa silvestre (Figura 7) (Di Pietro *et al.*, 2001). La incapacidad del mutante *fmk1* para invadir y macerar los tejidos vegetales podría estar relacionada con alteraciones en el patrón de enzimas secretadas que degradan la pared celular de la planta. De hecho, la expresión de una endopeptidasa está fuertemente reducida en el mutante *fmk1* (Di Pietro *et al.*, 2001).

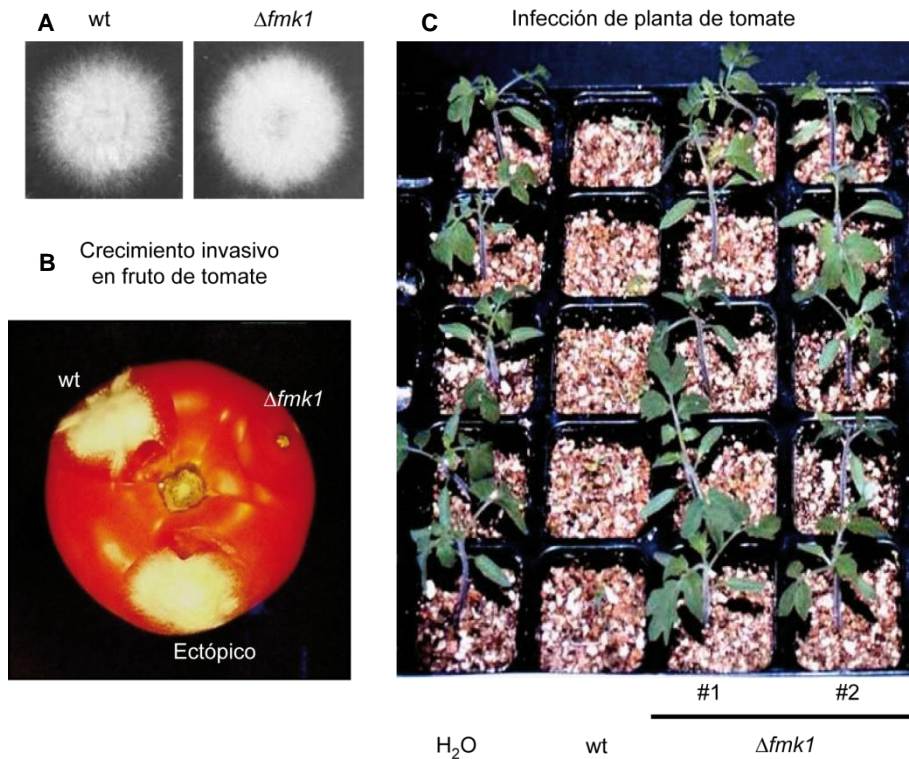


Figura 7. La MAPK Fmk1 de *F. oxysporum* no es necesaria para el crecimiento vegetativo pero sí para el crecimiento invasivo y para la infección en plantas de tomate. A. Esporas de las cepas indicadas crecidas en placas de PDA. B. Crecimiento invasivo en fruto de tomate. C. Síntomas de enfermedad en plantas de tomate. Adaptada de (Di Pietro *et al.*, 2001)

Cabe destacar que Fmk1 también es necesario para la anastomosis o fusión vegetativa de hifas (Rosales & Di Pietro, 2008) un proceso descrito en muchas especies de hongos filamentosos y cuya función biológica es poco conocida. La anastomosis no es imprescindible para la infección de la planta, aunque la creación de redes de hifas podría contribuir a la virulencia, la adhesión a la raíz y la exploración en busca de nutrientes durante el proceso de infección (Rosales & Di Pietro, 2008).

Se ha descrito que en *F. oxysporum* el factor de transcripción Ste12 está regulado por Fmk1 y que controla el crecimiento invasivo (Rispaill & Di Pietro, 2009). Mutantes en *ste12* mostraron una reducción significativa del crecimiento invasivo sobre frutos de tomates y manzana y en la penetración a través de membranas de celofán. Sin embargo, Ste12 no está relacionado con la anastomosis, la adherencia a la raíz o secreción de enzimas pectolíticas, sugiriendo que estas funciones deben estar controladas por otros factores regulados por Fmk1 (Rispaill & Di Pietro, 2009).

Los componentes de la ruta que actúan aguas arriba de Fmk1 han sido más recientemente en *F. oxysporum*. La mucina transmembrana Msb2 contribuye a la activación de la ruta, ya que los mutantes nulos de *msb2* tienen una reducida penetración del celofán, el crecimiento invasivo en el fruto y la virulencia en plantas de tomate (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011). Además mutantes en *mbs2* muestran niveles de fosforilación de Fmk1 más bajos que la cepa silvestre, sugiriendo que Msb2 funciona como activador de la ruta MAPK. (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011). Una segunda proteína transmembrana relacionada con la activación de Fmk1 es Sho1. El mutante en *sho1* tiene fenotipos similares a los mutantes en *msb2*, penetración del celofán y virulencia reducida, además de mostrar fosforilación reducida de Fmk1 (Perez-Nadales & Di Pietro, 2014). Ambas proteínas parecen tener también independientes, ya que el doble mutante muestra un efecto aditivo en algunos fenotipos.

2.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre las funciones de virulencia mediadas por Fmk1

Recientemente se ha descrito que algunas de las funciones dependientes de Fmk1 y relacionadas con la virulencia se regulan por la fuente de nitrógeno. En la cepa silvestre de *F. oxysporum* la penetración del celofán, la fusión de hifas, la adhesión a la raíz y la infección de plantas de tomate se inhiben en presencia de amonio, mientras permanecen activas en nitrato (López-Berges *et al.*, 2010). La utilización del nitrógeno es un proceso altamente regulado en todos los organismos. Aunque los hongos son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno, las preferidas son el amonio y la glutamina (Schure *et al.*, 2000). Esta utilización selectiva conlleva la represión de los genes necesarios para la utilización de fuentes de nitrógeno secundarias, un proceso conocido como represión por catabolitos del nitrógeno (Marzluf, 1997, Wong *et al.*, 2008). La implicación del amonio en la regulación del metabolismo del nitrógeno ha sido ampliamente estudiada en las especies *A. nidulans* y *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997, Caddick, 2004, Wong *et al.*, 2008).

Trabajos en *S. cerevisiae* y *A. nidulans* sugieren que es la glutamina y no el amonio, la principal señal que activa la represión por catabolitos del metabolismo del nitrógeno (Margelis *et al.*, 2001, Crespo *et al.*, 2002). Sin embargo, la glutamina no provocó la inhibición de las funciones de virulencia en *F. oxysporum* (López-Berges *et al.*, 2010). Por tanto el efecto represor del amonio en las funciones de virulencia podría deberse a un mecanismo independiente a la represión por catabolitos. Además, el mutante nulo en el gen *meaB*, un regulador positivo del catabolismo del nitrógeno, es capaz de penetrar el celofán, adherirse a raíces, realizar fusión vegetativa de hifas e infectar la planta en presencia de amonio (López-Berges *et al.*, 2010). Otra proteína implicada en la represión de dichas funciones de virulencia es la proteína quinasa TOR, un regulador maestro del crecimiento celular en

respuesta a nutrientes (Crespo & Hall, 2002, De Virgilio & Loewith, 2006, Wullschleger *et al.*, 2006, Rohde *et al.*, 2008). Así pues, la rapamicina, un inhibidor específico de TOR, revierte el efecto represor del amonio sobre las funciones de virulencia de *F. oxysporum*. Por tanto, TOR actuaría como represor negativo de al menos tres funciones de virulencia: El crecimiento invasivo, la fusión vegetativa de hifas y la adhesión a la raíz (Figura 8).

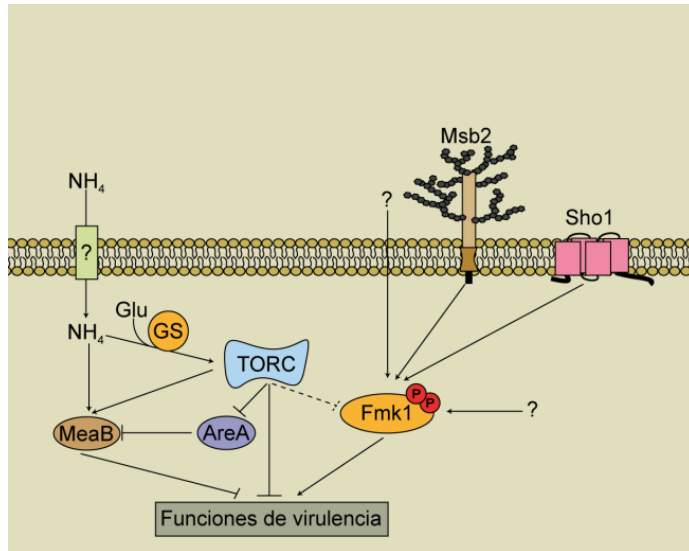


Figura 8. Modelo preliminar de la regulación negativa de las funciones de virulencia en *F. oxysporum* mediada por amonio, MeaB y TOR. Adaptada de (Lopez-Berges *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es identificar los factores ambientales producidos por el metabolismo del nitrógeno que regulan la virulencia en el hongo modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y caracterizar dicha ruta.

Para ello:

Estudiaremos la relación que existe entre el metabolismo del nitrógeno y otros factores ambientales.

Identificaremos, crearemos y analizaremos fenotípicamente diferentes mutantes que puedan regular la ruta de patogenicidad en respuesta a cambios en el medio.

Caracterizaremos el estado de fosforilación de las distintas MAPKs de *F. oxysporum* en respuesta a los cambios ambientales que se producen al metabolizar distintas fuentes de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales

3.1. Material biológico

3.1.1. Bacterias

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5 . Cepas bacterianas usadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Genotipado
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> . Receptora en experimentos de transformación genética para amplificación de plásmidos, PCR y secuenciación de ADN.

3.1.2. Hongos

Las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6 . Cepas fúngicas usadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente/Referencia
4287	Estirpe silvestre(raza 2)	Dr. J. Tello universidad de Almería
Δ <i>meaB</i>	<i>meaB</i> ::HYG	(López-Berges <i>et al.</i> , 2010)
Δ <i>meaB</i> + <i>meaB</i>	<i>meaB</i> ::HYG; <i>meab</i> , PHLEO	(López-Berges <i>et al.</i> , 2010)
Δ <i>mepB</i>	<i>mepB</i> ::HYG	Este estudio
Δ <i>mepB</i> + <i>mepB</i>	<i>mepB</i> ::HYG; <i>mepB</i> , PHLEO	Este estudio
Δ <i>ste12</i>	<i>ste12</i> ::HYG	(Rispaill & Di Pietro, 2009)
Δ <i>fmk1</i>	<i>fmk1</i> ::PHLEO	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
Δ <i>mpk1</i>	<i>mpk1</i> ::HYG	Turrà <i>et al.</i> sin publicar
Δ <i>mpk1</i> + <i>mpk1</i>	<i>mpk1</i> ::HYG; <i>mpk1</i> , PHLEO	Turrà <i>et al.</i> sin publicar
Δ <i>hog1</i>	<i>hog1</i> ::HYG	Este estudio
Δ <i>fmk1</i> Δ <i>mpk1</i>	<i>fmk1</i> ::PHLEO; <i>mpk1</i> ::HYG	Turrà <i>et al.</i> sin publicar
Δ <i>fmk1</i> Δ <i>hog1</i>	<i>fmk1</i> ::PHLEO; <i>hog1</i> ::HYG	Este estudio
Δ <i>mpk1</i> Δ <i>hog1</i>	<i>mpk1</i> ::HYG; <i>hog1</i> ::PHLEO	Este estudio

$\Delta msb2$	<i>msb2::HYG</i>	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2011)
$\Delta sho1$	<i>sho1::HYG</i>	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2014)
$\Delta sho1 + sho1$	<i>sho1::HYG; sho1,PHLEO</i>	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2014)

3.1.3. Material vegetal

Los distintos cultivares de los distintos materiales vegetales utilizados en este trabajo se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7 . Material vegetal usado en este trabajo.

Especie	cultivar	Características
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Mónica	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	Money Maker	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

3.1.4. Material animal

El material animal utilizado en este trabajo se recoge en la Tabla 8.

Tabla 8 . Material animal usado en este trabajo.

Especie	Proveedor	Características
<i>Galleria mellonella</i>	Animal Center S.A. (Valencia)	Larvas en estadio final de entre 0.1 y 0.2g

3.2. Vectores de clonación

Los vectores de clonación se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9 . Plásmidos usados en este estudio

Plásmido	Características	Fuente/Referencia
pGem®-T	Derivado de pGem®-5Zf (+), linearizado con la enzima <i>EcoRV</i> y con una Timina en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con Adenina en sus extremos. Confiere resistencia a ampicilina.	Promega
pAN7-1	Portador del gen <i>hph</i> de <i>Streptomyces ssp</i> bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	(Punt <i>et al.</i> , 1987)
pAN8-1	Portador del gen de resistencia a fleomicina bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	(Austin <i>et al.</i> , 1990)

3.3. Medios de cultivo

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

3.3.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

- Medio Luria-Bertani:

Líquido (LB): bacto triptona (10 gL⁻¹), extracto de levadura (5 gL⁻¹), NaCl (5 gL⁻¹). Suplementado con 0,005 % de ampicilina (p/v) para seleccionar estirpes resistentes.

Sólido (LA): medio líquido LB suplementado con 15 gL⁻¹ de bactoagar. Suplementado con 0,005 % de ampicilina (p/v) para seleccionar estirpes resistentes.

- Medio X-Gal. (LB + IPTG + X-Gal): Medio LA suplementado con 134 µM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), 0,005% (p/v) X-Gal (disuelto en formamida) y 0,005% ampicilina (p/v).

3.3.2. Medios para *F. oxysporum*

- Medio nutritivo:

PDB (del inglés, **potato dextrose broth**): Hervir 200 g de patatas peladas en 1 L de agua durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, filtrar, añadir 20 g de glucosa y llevar con agua destilada hasta un volumen de 1 L. Cuando fue necesario se añadió MES a una concentración de 100 mM y se ajustó el pH a 5 o a 7 con NaOH 10 N. Esterilizar en autoclave.

PDA (Del inglés, **potato dextrose agar**): 3,9% (p/v) de un compuesto constituido por agar, patata peptona y glucosa (Scharlau Microbiology). Cuando fue necesario se añadió MES a una concentración de 100 mM y se ajustó el pH a 5 o a 7 con NaOH 10N. Esterilizar en autoclave.

Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 µgmL⁻¹ en PDB o 55 µgmL⁻¹ en PDA) o fleomicina (2,4 µgmL⁻¹ en PDB o 6 µgmL⁻¹ en PDA). El pH del medio se ajustó a 8 con NaOH cuando contenía fleomicina.

YPD (del inglés, **yeast extract peptone dextrose**): extracto de levadura (3 gL⁻¹), peptona (10 gL⁻¹) y glucosa (20 gL⁻¹). Añadir 15 gL⁻¹ de bactoagar para medio sólido.

Medio mínimo Puhalla (Puhalla, 1968): MgSO₄·7(H₂O) 2 mM, KH₂PO₄ 7 mM, KCl 6 mM, NaNO₃ 25 mM y sacarosa 90 mM. Añadir 20 gL⁻¹ de agar oxid para medio sólido.

Este mismo medio fue utilizado sustituyendo el NaNO_3 por NH_4NO_3 en función del experimento. Y cuando fue necesario se añadió MES a una concentración 100 mM y se ajustó el pH a 5 o a 7 con NaOH 10N según el medio.

Medio mínimo de regeneración: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, KH_2PO_4 7 mM, KCl 6 mM, NaNO_3 25 mM, glucosa 10 mM, sacarosa 60 mM y agar oxoid ($12,5 \text{ gL}^{-1}$ para las placas y 4 gL^{-1} para la cobertera). Para seleccionar resistentes a fleomicina fue necesario ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N después de la esterilización.

Medio con ácido poligalacturónico (PGA): poligalacturonato sódico (5 gL^{-1}); sacarosa 15 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM, MES 100 mM y agar oxoid (15 gL^{-1}), el pH se ajustó a 5 o a 7 con NaOH 10 N según el medio.

3.3.3. Compuestos químicos

Para llevar a cabo distintos ensayos de sensibilidad o tinción con compuestos químicos se prepararon distintas soluciones que se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10 .Soluciones de almacenamiento de compuestos químicos.

Compuesto (Fuente)	Preparación	Almacenamiento
Rojo congo (Sigma)	1% (p/v) en agua	-20°C en oscuridad
Blanco de calcoflúor (Sigma)	1% (p/v) en 0.5% (p/v) KOH y 83% (v/v) glicerol	-20°C en oscuridad
Rapamicina (Sigma)	0.1% (p/v) en DMSO	-20°C en oscuridad
Menadiona (Sigma)	1% (p/v) en DMSO	-20°C en oscuridad
L-Metionina sulfoximina (Sigma)	5% (p/v) en agua	4°C
Ioprodione (Sigma)	1% (p/v) en etanol	-20°C
Fludioxonil (Sigma)	1% (p/v) en DMSO	-20°C
Bromocresol purple (Sigma)	0.045% (p/v) en agua	Temperatura ambiente en oscuridad
Bromocresol green (Sigma)	0.045% (p/v) en agua	Temperatura ambiente en oscuridad

3.4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación, secuenciación y extensión se diseñaron con el programa Oligo (versión 6.65; 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 , T_d , %G + C, %A + T). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por diversas casas comerciales (Bonsai Technologies y Eurofins MWG Operon). La Tabla 11 resume todos los oligonucleótidos usados en este trabajo. Las secuencias terminales incluidas en los oligonucleótidos para favorecer la hibridación y poder generar la construcción se resaltan en negrita.

Tabla 11 . Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Cebador	Secuencia(5' → 3')
m13for	cgccagggtttcccagtcacgac	m13rev	agcggataacaatttcacacagga
hygG	cgttgcaagacctgcctgaa	hygY	ggatgctccgctcgaagta
tripter4	cctgggttcgcaaagataatt	gpda15	cgagacctaatacagcccct
phl	atgtgaccagtgccgttccg	leo	gccacgaagtgcacgcagtt
mepBfor	gatgagacccccacctg	mepBrev	ttgctgggaaatcgtaggtctt
mepBforrest	gagaccatgggtgagcttcag	mepBrevnest	cgtaggtctttcactagccgt
mepBhyg1	gtgactgggaaaaccctggcgt accgttatactgagctgcgt	mepBhyg2	tcctgtgtgaaattgttatccgcta ccacagatcccttagtctcc
hog1f1	ctccatgtcctgtcggtagg	hog1r3	cagctggtgcttccctcct
hog1f2	gcctctcgactcccctagtt	hog1r2	tcaaagcgggtgagcgtgtg
hog1m13fr1	gtgactgggaaaaccctggcgt ggaccgatgatgggtcagg	hog1m13rf3	tcctgtgtgaaattgttatccgcta cggaggaggatgctaccag
hog1stop	ctgtccgtgaattgctcctc	trpter8	aaacaagtgtacctgtgcattc

3.5. Programas informáticos y páginas webs

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 Tabla 12.

Tabla 12 .Programas informáticos usados para el análisis de datos en este trabajo.

Programa	Aplicación
BLAST (NCBI)	Búsqueda de secuencias similares a la problema
Adobe illustrator CS3	Elaboración y tratamiento de figuras
Adobe photoshop CS3	Edición de imágenes
GraphPad Prism 6	Elaboración de gráficos
ImageJ	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 6	Diseño y análisis de oligonucleótidos
DNASTar Lasergene	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
Página web	Aplicación
Broad Institute <i>Fusarium</i> Comparative Database (http://www.broadinstitute.org)	Búsqueda de secuencias nucleotídicas o proteicas
<i>Saccharomyces</i> Genome Database	Búsqueda de información sobre genes y/o proteínas en <i>Saccharomyces</i>

4. Métodos

4.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos

4.1.1. *E. coli*

E. coli se cultivó en medio líquido LB a 37 °C con agitación (250 rpm), y en medio sólido 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 líquido con 30% glicerol (v/v). Para periodos cortos se mantuvieron en medio LB sólido a 4 °C.

4.1.2. *Fusarium oxysporum*

Los cultivos de hongos se incubaron a 28 °C; para los realizados en medio líquido se aplicó agitación orbital (170 rpm). Al medio se le añadió higromicina y/o fleomicina para la selección y cultivo de estirpes resistentes a dichos antibióticos.

Para la conservación de las estirpes se recogieron las esporas de un cultivo de 3-5 días crecido en medio PDB, a través de un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm), separándolas así del micelio producido, que se secó con papel de filtro y se conservó a -80 °C hasta su utilización. Los filtrados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las esporas recogidas se lavaron con agua destilada estéril y se almacenaron a -80 °C resuspendidas en 30% glicerol (v/v). Estas suspensiones de esporas se emplearon como inóculo para la obtención de esporas frescas para los distintos ensayos

4.1.3. Plantas de tomate

Las semillas de tomate se esterilizaron sumergiéndolas en 20% de lejía (v/v) durante 30 minutos y seguidamente tres lavados de 10 minutos cada uno con abundante agua. Una vez sembradas en vermiculita humedecida, se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a una temperatura de 28 °C. Los ensayos de infección se realizaron con plantas de 14 días, en las que ya habían aparecido el primer par de hojas verdaderas. Para llevar a cabo la infección, las raíces se introdujeron en una dilución de 5×10^6 esporas mL⁻¹ durante media hora.

4.2. Aislamiento de ácidos nucleicos

4.2.1. Aislamiento de ADNp de *E.coli* con CTAB (miniprep)

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson con algunas modificaciones (Murray & Thompson, 1980).

Se partió de un cultivo estacionario de la estirpe portadora del plásmido crecido en 5 mL de medio LB con la selección apropiada. Se centrifugaron 3 mL de cultivo durante 2 minutos a 13.000 rpm y tras retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 200 µL de STET (sacarosa 25 mM, 1% Tritón-X100 (v/v), EDTA 50 mM y Tris-HCl 50 mM pH8). A continuación se añadieron 4 µL de lisozima (50 mgmL⁻¹) para provocar la lisis celular y 2 µL de ARNasa A (10 mgmL⁻¹) para eliminar el ARN contaminante y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente la muestra se hirvió a 100 °C durante 45

segundos y se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. Los restos celulares de aspecto mucoso se retiraron con un palillo, se añadieron 10 µL de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio 15mM) para precipitar el ADN y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 5 minutos a 13.000 rpm se desechó el sobrenadante y el ADN se resuspendió en 300 µL de una solución de NaCl 1,2 M y 750 µL de etanol absoluto frío. Se homogeneizó bien y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 20 µL de agua desionizada.

Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 0,7% agarosa (p/v).

4.2.2. Extracción de ADNg de *F. oxysporum*

Método de CTAB:

El protocolo está basado en el descrito por Torres y colaboradores con algunas modificaciones (Torres *et al.*, 1993).

La purificación de ADNg se realizó a partir de micelio de un cultivo del hongo de 3-4 días, recogido por filtración a través de un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm). Una vez secado el micelio con papel de filtro, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Con ayuda de un mortero, se pulverizaron unos 100 mg de micelio en nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial de 2 mL que contenía 1 mL de tampón de extracción CTAB (Trizma Base 100 mM, EDTA 2 mM, NaCl 1.5 M y Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 5 mM). Se homogenizó vigorosamente, se añadieron 4 µL de β-mercaptoetanol y 500 µL de una solución cloroformo:octanol (24:1, v/v), y se incubó a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 7.000 rpm. A la fase soluble se le añadió 1 mL de etanol absoluto frío y se mantuvo a -20 °C durante 10 minutos. Después se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm, se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v) y el ADNg se resuspendió en 50 µL de agua desionizada. Por último, se añadieron 4 µL de ARNasa A (10 mgmL⁻¹) y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos.

Método de ruptura con bolas de vidrio (glass beads):

Para la obtención de ADNg por el método "Glass Beads" se utilizó el micelio obtenido de una colonia de 1 cm² del hongo en medio sólido. En un tubo estéril de 2 mL se añadieron aproximadamente 0,3 g de Glass Beads (Sigma), 500 µL de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 1% SDS p/v) y el micelio previamente fragmentado con una

espátula de metal esterilizada. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 1 minuto y a continuación en un Mini Beadbeater tres veces durante 20 segundos. En este proceso las bolas de cristal machacan el micelio hasta dejar partículas finas. A continuación se centrifugó 2 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 275 μL de una solución de acetato de amonio 7 M a pH 7. Seguidamente las muestras se incubaron 5 minutos a 65 °C y otros 5 minutos en hielo para finalmente añadir 500 μL de cloroformo y ser homogenizadas en un vórtex. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 13.000 rpm. La fase superior resultante se transfirió a un tubo de 2 mL al que se le añadió 1 mL de isopropanol; se homogeneizó vigorosamente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. El pellet resultante se lavó dos veces añadiendo 1 mL de etanol al 70% (v/v), centrifugando 5 minutos a 13.000 rpm y eliminando el sobrenadante. Finalmente las muestras se secaron en el Speed Vac y se resuspendieron en 50 μL de agua desionizada. Por último, se añadieron 4 μL de ARNasa (10 mgmL^{-1}) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

4.3. Manipulación de los ácidos nucleicos

4.3.1. Electroforesis de los ácidos nucleicos en gel de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa disuelta en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM a pH 8). La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0,7 y 2% (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 Vcm^{-1} .

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

4.3.2. Recuperación de fragmentos de 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.

4.3.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

Tratamiento con endonucleasas de restricción:

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por las casas comerciales Roche y Fermentas. Los tratamientos se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se utilizaron 1-2 unidades de enzima por μg de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10% del volumen total. En el caso de los tratamientos de ADN_g para análisis Southern blot, se digirieron 1-2 μg de ADN_g. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima durante 3 horas. Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico a 65 °C.

Desfosforilación:

La reacción se llevó a cabo usando la fosfatasa alcalina de gamba (SAP Del inglés shrimp alkaline phosphatase) (Roche). Se añadió 1 unidad de SAP por cada 50 ng de plásmido linearizado y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se inactivó la enzima incubándola a 65 °C durante 15 minutos.

Esta desfosforilación se realizó para disminuir la frecuencia de reacciones intramoleculares durante la ligación y, por tanto, el número de plásmidos sin inserto.

Clonación de fragmentos de ADN en vectores:

La unión de fragmentos de ADN a vectores linearizados se llevó a cabo utilizando 1 unidad de 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[®].

Cuantificación de los ácidos nucleicos:

La concentración de las muestras de ADN se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm, empleando para ello un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000. Habitualmente, se cuantificó por comparación de la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño 1 KB plus DNA Marker (Enzimax), tras electroforesis en gel de agarosa.

Hibridación y detección de ácidos nucleicos:

La transferencia de ADN en gel de agarosa para análisis Southern blot se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Sambrook & Russell, 2001). Para el marcaje de la sonda

no isotópica con digoxigenina se usó un kit comercial (Roche Diagnostics) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Precipitación de ADN:

La precipitación de ADN se llevó a cabo añadiendo 1:10 parte de una solución de acetato de sodio 3 M (v/v) y tres volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y, se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, se lavó dos veces el sedimento con 70% etanol (v/v), se dejó secar y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

Precipitación de sondas marcadas con digoxigenina:

La precipitación de sondas marcadas se realizó añadiendo 1:10 parte de una solución de cloruro de litio 8 M (v/v) y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µL de agua desionizada.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.4.1. PCR estándar

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un termociclador y, según la finalidad del experimento, se emplearon polimerasas termoestables (BIOTAQ™ DNA polymerase de Boline o Expand High Fidelity de Roche), en las condiciones de reacción indicadas en las instrucciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 nM de cada uno de los dos cebadores empleados, la concentración de MgCl₂ adecuada, 0,8 mM de la mix de dNTPs y 0,05 UµL⁻¹ de polimerasa. La cantidad de ADN molde empleada fue de entre 5-10 ngµL⁻¹ de ADNg 1-5 ngµL⁻¹ de ADN plasmídico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13 . Condiciones de PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	35 seg	35
Hibridación	Según cebador	35 seg	
Extensión	72/68 °C	1 min Kb ⁻¹	
Extensión final	72/68 °C	7 min	1

Cuando se usó la polimerasa Expand high fidelity y el tiempo de extensión sobrepasó los 3 minutos, se bajó la temperatura de extensión a 68 °C.

4.4.2. PCR de marcaje de la sonda

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

4.4.3. Construcción de mutantes nulos mediante Split-marker

Protocolo basado en el descrito por (Catlett *et al.*, 2003). Esta técnica es muy ventajosa a la hora de generar alelos interrumpidos, ya que al forzar el mecanismo de doble recombinación reduce, en gran medida, los falsos positivos obtenidos por recombinación heteróloga.

Gracias a esta técnica, es posible obtener dos fragmentos de ADN solapantes en dos rondas de PCR (Figura 9.A.). En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias adyacentes del gen a interrumpir (1,5Kb), usando el ADN_g del hongo como molde, y el gen marcador (higromicina B o fleomicina), obtenido también por PCR a partir de un vector portador de dicho casete. En la segunda ronda de PCR se fusionan dichos amplicones al gen marcador mediante PCR de fusión (Carroll *et al.*, 1994). Para conseguir que ambos fragmentos queden fusionados, los oligonucleótidos del gen diana fueron diseñados con 30 nucleótidos en el extremo 5' complementarios al extremo 3' o 5' del casete de resistencia, y por lo tanto eran susceptibles de fusionar con dicho casete.

Para la obtención de mutantes con alelos delecionados se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* o de diferentes mutantes en el caso de la obtención de mutantes dobles, empleando las dos construcciones solapantes obtenidas anteriormente. El hecho de recombinación esperado es la sustitución homóloga del gen diana por el casete de resistencia (Figura 9.B:). Para ello, las dos construcciones deben recombinar entre sí en el interior del hongo, obteniéndose una única construcción con el casete de resistencia completo y funcional, que a su vez deberá recombinar de manera homóloga en el gen diana, sustituyendo el alelo silvestre por el casete de resistencia.

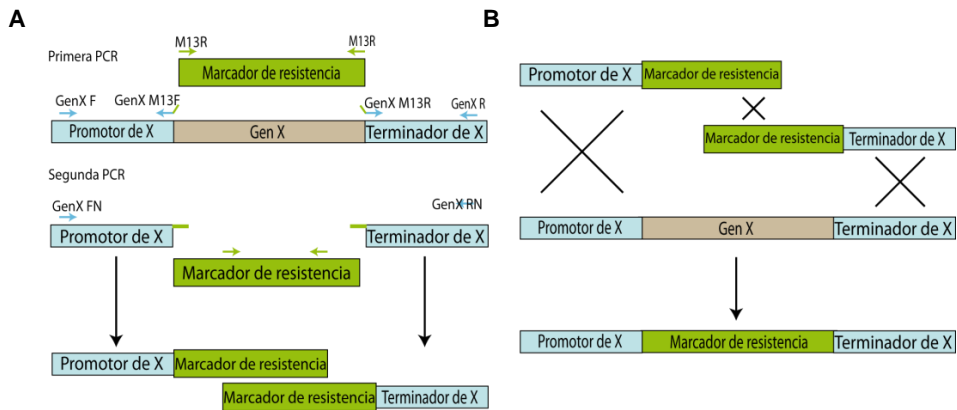


Figura 9. Esquema de delección génica mediante la técnica de Split-marker. A. Esquema de la obtención de las construcciones mediante dos PCR. B. Esquema del suceso de recombinación homóloga en *F. oxysporum*.

4.5. Transformación genética

4.5.1. Transformación de *E. coli*

Para obtener y transformar células competentes se siguió un protocolo basado en el descrito por (Kushner, 1978) con algunas modificaciones.

Obtención de células competentes:

Una colonia fresca de *E. coli* DH5 α se inoculó en 5 mL de PSI-b (5 gL⁻¹ extracto de levadura; 20 gL⁻¹ triptona y MgSO₄ 7H₂O 20 mM, pH ajustado a 7,6 con KOH) y se incubó 12 horas a 37 °C con agitación. El cultivo estacionario se transfirió a 100 mL de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la densidad óptica a 550 nm fue de 0,45 - 0,5. A continuación, se enfrió el cultivo en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 7.000 rpm. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 mL de solución Tfb-1 (acetato potásico 30 mM a pH 6,9; MnCl₂ 50 mM; KCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM y 15% glicerol (v/v)) fría. Tras una incubación de 5 minutos en hielo se volvieron a centrifugar a 7.000 rpm y a 4 °C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 mL de solución Tfb-2 (MOPS 10 mM a pH 7,0; CaCl₂ 75 mM; KCl 10 mM y 15% glicerol (v/v)) fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 minutos, se repartieron en alícuotas de 100 μ L en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Transformación de células competentes:

Se usaron 50 μ L de células competentes, descongeladas en hielo, a las que se les añadió 5 μ L de la solución de ADN y se incubaron 30 minutos en hielo. Transcurrido este

tiempo las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 1 minuto e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 minutos. Para permitir la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante 15 minutos con 100 µL de medio LB. Por último, se sembró toda la mezcla de transformación en placas de medio selectivo, y se incubaron a 37 °C durante 12-14 horas.

4.5.2. Transformación de *F. oxysporum*

Obtención de protoplastos:

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo de (Powell & Kistler, 1990) con algunas modificaciones.

Esporas del hongo de la estirpe deseada congeladas en glicerol se inocularon en medio PDB y se cultivaron de 3-5 días a 28 °C en agitación. Transcurrido este tiempo se recogieron las esporas frescas y se inocularon 5×10^8 en 200 mL de PDB. Tras 14 de incubación a 28 °C y a 170 rpm, las germínulas obtenidas se recogieron por filtración con un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro 10-15 µm) y se lavaron con abundante solución OM ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 M; Na_2HPO_4 0,1 M, pH 5,8-6,0 ajustado con ácido ortofosfórico). A continuación, se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 mL de solución OM conteniendo 0,5% (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (*Glucanex* de Novozymes). El tratamiento enzimático se mantuvo 45 minutos a 30 °C y con agitación suave. Transcurrido este tiempo se comprobó al microscopio la formación de protoplastos. Cuando el número y la calidad fue la adecuada, la muestra se filtró a través de 2 filtros de nailon (Monodur, 10-15 µm) y se lavó con solución STC (sorbitol 0,8 M; CaCl_2 50 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) hasta llenar 6 tubos de centrifuga de 30 mL manteniéndose en hielo en todo momento. Posteriormente, se centrifugó a 3.000 rpm y a 4 °C durante 15 minutos utilizando un rotor basculante para recoger los protoplastos obtenidos. Éstos se resuspendieron muy suavemente en 1 mL de solución STC y se determinó su concentración, mediante observación al microscopio usando una cámara de Thoma. Se repartieron en alícuotas de 100 µL a una concentración de 2×10^8 protoplastos mL^{-1} . A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80 °C en 10% de PEG (polietilenglicol 4000 170 mM disuelto en MOPS 0,6 M) y 1% de DMSO (v/v).

Cotransformación de protoplastos:

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Malardier *et al.*, 1989) con algunas modificaciones. En un vial se mezclaron 1-2 µg de ADN transformante (la proporción de cada fragmento debe ser equimolecular) con 10 µL de ácido aurintricarboxílico 0,1 M (ATA), un

fuerte inhibidor de nucleasas, y se llevó a un volumen final de 60 μL con solución TEC (Tris-HCl 10 mM a pH 7,5; EDTA 1 mM y CaCl_2 40 mM). También se preparó un control sin ADN consistente en 10 μL de ATA y 50 μL de solución TEC. Para experimentos de complementación, se añadió 1,5 μg del ADN que confería la resistencia al antibiótico y el doble de ADN de interés.

Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, el ADN fue centrifugado 2 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se mezcló suavemente con los protoplastos y, de nuevo, se volvió a incubar en hielo durante 20 minutos. Seguidamente se añadieron y homogeneizaron lentamente 160 μL de solución PEG y se prolongó la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los cuales se añadió 1 mL de solución STC. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para concentrar los protoplastos en 200 μL de solución STC.

Se mezclaron entonces alícuotas de 50 μL de la solución de protoplastos, que contenían el ADN, con 3 mL de agar de cobertera (0,4 % de agar (Oxoid) (p/v) en medio mínimo de regeneración) precalentado a 45 $^{\circ}\text{C}$ y se sembraron en medio sólido de regeneración. Seguidamente, se incubó a 28 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de tiempo variable en función del antibiótico con el que se seleccionó para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina B se mantuvieron 14 horas y para la selección con fleomicina, 90 minutos.

En el caso del control, sin ADN, se realizaron diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en STC, añadiendo 100 μL de cada una de ellas a 3 mL de agar de cobertera y sembrando en placas de medio mínimo de regeneración, con el fin de determinar el porcentaje de regeneración y viabilidad de los protoplastos. Además, se realizó una dilución 10^{-4} en agua desionizada, lo que provoca la desestabilización de los protoplastos y su consiguiente muerte, de la cual 100 μL fueron sembrados con agar de cobertera y sembrados en placas para determinar el porcentaje de esporas presentes. Para el último control se mezclaron 190 μL de la solución control con 3 mL de agar de cobertera y se sembraron, con el fin de certificar la ausencia de crecimiento en medio selectivo. Estos controles se incubaron a 28 $^{\circ}\text{C}$ el mismo tiempo que las placas que contenían en ADN transformante. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron otros 3 mL de agar de cobertera que contenían el antibiótico de selección, 2 mg de higromicina B ó 0,2 mg de de fleomicina, excepto en los controles de regeneración y en el control de esporas. Por último, se incubaron a 28 $^{\circ}\text{C}$ hasta la aparición de colonias con fenotipo transformante.

Los transformantes obtenidos se sembraron en placas de PDA selectivas como paso previo a la obtención de colonias puras, originadas a partir de una única espora.

Posteriormente, los transformantes obtenidos fueron confirmados mediante amplificación selectiva por PCR y por análisis Southern.

Para la complementación del mutante *hog1*, se realizó el mismo protocolo descrito arriba, con la excepción de que antes de sembrar los protoplastos en el medio de regeneración, se incubaron en OM durante 14 horas a 28 °C y con una agitación suave. Posteriormente, se sembraron como anteriormente se ha descrito, añadiéndole a la vez el antibiótico de selección (en este caso la fleomicina).

4.6. Ensayos de patogenicidad

4.6.1. Infección de plantas de tomate

Para analizar el patotipo de los mutantes de *F. oxysporum* obtenidos en este trabajo se inocularon plantas de tomate del cultivar Monika (Syngenta seeds, Almería, España) o Money Maker (La Mayora, CSIC, Málaga) con suspensiones de esporas de las diferentes cepas. (Di Pietro & Roncero, 1998). Las esporas se recogieron por filtración y posterior centrifugación a 10.000 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 se cultivaron en vermiculita hasta que presentaron sus primeras hojas verdaderas (15 días). Tras retirarlas cuidadosamente de la vermiculita se lavaron debajo del grifo suavemente. Seguidamente se sumergieron 10 raíces de plantas durante 30 minutos en una suspensión acuosa con 5×10^6 esporas mL⁻¹, en placas de Petri. A continuación las plantas se trasplantaron a semilleros individuales con vermiculita y se cultivaron en cámara de cultivo con tubos fluorescente (36 W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a 28 °C.

La evolución de la enfermedad se evaluó durante las semanas siguientes a la infección. Para ello se utilizaron los índices de enfermedad descritos por (Huertas-Gonzalez *et al.*, 1999) que se corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y peciolo caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido; 5, planta muerta (Figura 10). La evolución de la enfermedad también se definió como el porcentaje de supervivencia de las plantas tras 30-40 días usando el método Kaplan-Meier, analizando los datos con el programa GraphPad Prism.

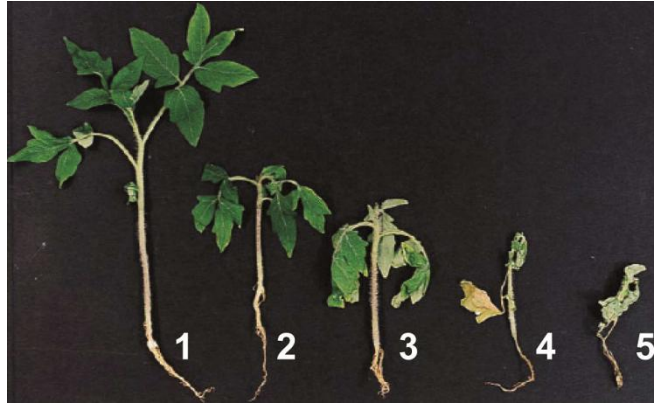


Figura 10. Distintos estadios de la fusariosis vascular en plantas de tomate.

4.6.2. Infección de *Galleria mellonella*

La infección de *G. mellonella* se realizó como describe (Navarro-Velasco *et al.*, 2011). Las larvas de *G. mellonella* en estado final de oruga se obtuvieron de la compañía Animal Center (Valencia) se mantuvieron a 30 °C en botes de cristal aireados con una dieta artificial estéril y en oscuridad durante dos días después de la entrega. Se seleccionaron al azar 20 larvas con un peso comprendido entre 0,1 y 0,2 g, y se infectaron con 0.8 μ L (1.6×10^5 esporas resuspendidas en PBS: NaCl 0,15 M, KCl 3 mM, NaPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM a pH 7.4). Con ayuda de una jeringuilla de 1 mL y un microinyector (Burkard Auto Microapplicator de 0,1 a 10 μ L) se inyectaron a las larvas dentro del hemocele a través de la penúltima pata. Se inyectaron también 20 larvas con 0.8 μ L de PBS como control negativo de la infección. Antes de cada inyección, el área fue limpiada con alcohol. Después de la inyección las larvas fueron colocadas en frascos de vidrio con tapas agujereadas y se incubaron a 30 °C. El número de larvas muertas se evaluó diariamente considerándose al individuo como muerto cuando estaban melanizadas y no respondían con movimiento en respuesta al toque.

La supervivencia fue monitorizada cada día durante 8 días, se estimó y se comparó entre grupos usando el método Kaplan-Meier (utilizando el programa estadístico GraphPad Prism). Se consideró que los grupos eran estadísticamente diferentes cuando la P-value fue <0,05. Cada experimento se repitió al menos tres veces con similares resultados, en este trabajo se muestra sólo la que hemos considerado más representativa.

4.6.3. Ensayo de producción de poligalacturosas extracelulares

Se inocularon placas PGA, tamponadas a pH5 o a pH7, con 2×10^4 esporas y se incubaron a 28 °C durante 4 días. Pasado el tiempo se vertieron 20 mL de HCl 0,4 N sobre la placa y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se retiró la

solución anterior, se aclaró la placa con agua y se incubó durante 10 minutos a 4 °C. El tratamiento con HCl hace precipitar al ácido poligalacturónico quedando toda la placa de color blanco, salvo en aquellas zonas, alrededor de la colonia fúngica en las que el polímero ha sido degradado por la acción de las poligalacturonasas extracelulares, pudiéndose observar un halo transparente (Di Pietro *et al.*, 1998).

4.6.4. Ensayo de penetración de membranas de celofán

Este ensayo mide la capacidad del hongo de producir enzimas que degradan el celofán (polímero de celulosa) y, a su vez, la capacidad de ejercer una presión física sobre una superficie rígida.

Se prepararon placas con el medio a ensayar sobre las que se colocó una membrana de celofán, previamente recortado con un diámetro inferior al de la placa de Petri y esterilizados. Sobre el celofán se inoculó una gota de 5 μL con 5×10^4 esporas. Las placas se incubaron a 28 °C durante 2 ó 4 días (según el medio); pasado este tiempo se retiró la membrana de celofán junto con la colonia fúngica y se incubó 24 horas más a 28 °C. Tanto el crecimiento del hongo antes de retirar el celofán, como la penetración o no del mismo fueron documentados mediante el escaneo de las placas (Prados-Rosales & Di Pietro, 2008).

4.6.5. Ensayo de aglutinación de hifas

Se inocularon, en un tubo de inóculo 2×10^6 esporas en 1 mL de PDB diluido 50 veces y suplementado con ácido glutámico 25 mM, NaNO_3 25 mM o NH_4NO_3 (cuando se ensayó el efecto del pH sobre la aglutinación, se tamponó con MES 100 mM a pH 7 ó 5), según corresponda. La incubación se realizó durante 36 horas a 28 °C a 270 rpm de agitación.

Pasado este tiempo, el cultivo se agitó vigorosamente para disgregar las uniones débiles y se traspasó íntegramente a una placa de cultivo celular multipocillo (6X4) donde se observó la presencia de agregados aglutinados de hifas bajo la lupa (Prados-Rosales & Di Pietro, 2008).

4.6.6. Medición de amonio

En este ensayo se trata de relacionar el transporte de amonio hacia el interior del hongo con la acidificación del medio.

Se germinaron 5×10^8 esporas en 200 mL de PDB durante 15 horas a 28 °C y a 270 rpm. Transcurrido ese tiempo, se recogieron las germinulas y se pasaron a 30 mL de medio mínimo Puhalla con NH_4NO_3 5 mM, o NH_4NO_3 5 mM con MSX 5 mM o con NH_4NO_3 5 mM con 5 ng/mL de rapamicina. A todos los medios se le ajustó el pH a 5 con NaOH 1 N y se esterilizaron por filtración. A diferentes tiempos se recogieron alícuotas de 500 μL de medio

que se centrifugaron para eliminar las germínulas. Se midió el pH del sobrenadante, con ayuda de un electrodo para micromuestras.

La concentración de amonio del sobrenadante se determinó usando el kit comercial Ammonia Assay Kit (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Las mediciones se realizaron en placas multipocillo de 96 a una absorbancia de 340 nm en un espectrofotómetro de placas multipocillo (Spectrafluor Plus, Teca). 5 μ L del sobrenadante (diluido 1:25 (v/v)) se incubaron con 100 μ L de Ammonia Reagent durante 5 minutos y se realizó la primera medida de absorbancia. Después se añadieron 10 μ L de L-glutamato deshidrogenasa (diluida 1:10 (v/v)) en tampón fosfato 50 mM a pH 7,4), se incubó 5 minutos y se midió la absorbancia nuevamente a intervalos de 5 minutos hasta que la medida se estabilizó. La concentración de amonio se calculó realizando una curva patrón con concentraciones conocidas de amonio (de 2,5 mM a 0.0625 mM) y después multiplicando por el factor de dilución.

4.7. Análisis de proteínas MAPK

4.7.1. Obtención de las muestras

Se inocularon $1,5 \times 10^9$ esporas y 10^9 esporas en dos matraces con 300 mL y 200 mL, respectivamente, de PDB suplementado con 100 mM de MES y el pH ajustado a 7 con NaOH. Tras 15 horas de incubación a 28 °C y 170 rpm, se filtraron 100 mL del matraz de 300 mL, se recogieron las germínulas y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido ($t=0$). Después se bajó el pH del cultivo a 5 (añadiendo poco a poco HCl puro, aproximadamente 2.5 mL) y se incubaron en las mismas condiciones durante 15 y 30 minutos, tiempos en los que se volvieron a recoger germínulas de uno de los matraces del mismo modo anteriormente descrito. Por último, al matraz que queda se le subió el pH a 7 nuevamente, añadiendo NaOH 10 N (aproximadamente 1.5 mL), y se volvieron a recoger las germínulas a los 15 y 30 minutos. Las germínulas congeladas se conservaron a -80 °C hasta su uso.

4.7.2. Extracción de proteínas

Para la obtención de los extractos proteicos a partir de micelio se aplicó el método basado en lisis celular mecánica, separación y eliminación de restos celulares por centrifugación.

Para la lisis celular, aproximadamente 100 mg de micelio, se homogenizó con nitrógeno líquido hasta conseguir un fino polvo. El micelio homogenizado se resuspendió en 300 μ L de tampón de extracción C (10% glicerol (v/v), Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % SDS (p/v), 1% Tritón, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, 1% cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, P8215), NaF 50 mM, Na_2PO_7 3 mM, β -glicerofosfato 50 mM, Na_3VO_4 1 mM y una pastilla de inhibidor de fosfatasa por cada 50 mL de tampón) frío y se mezcló vigorosamente por vórtex.

A continuación, se centrifugó 10 minutos a 4 °C a 13.000 rpm, y se recuperó el sobrenadante que se guardó a -80 °C hasta su uso.

4.7.3. Cuantificación proteica

La concentración de proteínas se determinó usando el kit de Bio-Rad DC™ Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la recta patrón se usaron diluciones seriadas de seroalbúmina bovina (BSA) a concentraciones conocidas (desde 6.66 a 0.17 µg).

Una vez cuantificadas y alicuotadas las proteínas se separaron en un gel de acrilamida y se tiñeron con Comassie (ver apartado 4.7.4.) para observar el estado de degradación de las proteínas y comprobar que la cuantificación era correcta.

4.7.4. Electroforesis desnaturante en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, del inglés sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electroforesis) (Laemmli, 1970). Esta técnica permite la separación de los polipéptidos en función de su tamaño.

Preparación de las muestras:

Los extractos proteicos se alicuotaron todos a la misma concentración de proteínas, se mezclaron con tampón de carga (Tris-HCl 50 mM a pH 6,8, 8% glicerol (v/v), 1,6% SDS (p/v); 4% β-mercaptoetanol (v/v) y 0,1% azul de bromofenol (p/v) y se hirvieron durante 10 minutos. Posteriormente, los extractos se atemperaron en hielo y se cargaron en un gel de poliacrilamida.

Preparación del gel:

Gel separador 14% (8mL): se mezclaron 2 mL de solución LGB (Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8; 0,4% SDS) con 2,8 mL de Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 al 40%, y 3,2 mL de agua desionizada. La polimerización se inició al añadir 40 µL de persulfato de amonio al 10% (p/v) y 10 µL de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina). Tras verter la mezcla entre los dos cristales, se añadió suavemente agua hasta el borde con el fin de eliminar las burbujas. Una vez que el gel separador polimerizó, se retiró el agua.

Gel concentrador 5 % (5mL): se mezclaron 1,25 mL de solución UGB (Tris-HCl 0,5M a pH 6,8, 0,4% SDS (p/v)) con 0,5 mL de Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 al 40% y 3 mL de agua desionizada. La polimerización se inició tras la adición de 30 µL persulfato de amonio al 10% (p/v) y 10 µL de Temed. Esta mezcla se añadió lentamente entre los cristales que ya tenían el gel separador. Se colocó el peine y se dejó polimerizar.

Electroforesis:

La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina (Trizma base 25 mM; glicina 192 mM y 0,1% SDS (p/v)) a un voltaje de 80 V durante 45 minutos y de 180 V durante 90 minutos en el sistema vertical mini Protean® cell de Bio-Rad.

Tinción de los geles con Coomassie:

Tras la electroforesis los geles se tiñeron con la solución Coomassie (0,1% Azul de Coomassie (p/v); 60% metanol (v/v); 10% ácido acético (v/v)) durante al menos una hora. Para desteñir los geles se realizaron dos lavados de al menos 30 minutos en High destein (60% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v)) y dos lavados de una hora en low destein (5% metanol (v/v) y 7% ácido acético (v/v)).

4.7.5. Análisis western blot

Para los análisis de hibridación Western blot se emplearon 100µg de proteínas resuspendidas en tampón de carga y separadas en geles de poliacrilamida al 14% siguiendo las condiciones de electroforesis indicadas en el apartado (ver apartado 4.7.4.)

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando el Mini Trans-blot® Cell (Bio-Rad) y tampón de transferencia (Trisma base 100 mM, glicina 40 mM; 0,0375% SDS (p/v) y 20% metanol (v/v)) a 100 V durante 2 horas a 4 °C. Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de skim milk disuelto en TBST (trisma base 42 mM, NaCl 13 mM, 0.1% tween 20 (v/v)) a pH 7,6 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Antes de incubar con el anticuerpo primario la membrana se lavó varias veces con TBST pH 7,6 para eliminar el exceso de skim milk. El anticuerpo primario se mantuvo a 4 °C durante toda la noche con 1% BSA (p/v) en TBST, mientras que el secundario se incubó durante una hora a temperatura ambiente con 5% skim milk (p/v) en TBST. La fosforilación de las MAPKs Fmk1 y Mpk1 se detectó usando el anticuerpo primario Pp42/p44 MAP Kinase (Cell Signaling Technology #4370), y de la MAPK Hog1 usando el anticuerpo primario Pp38 MAP Kinase (Cell Signaling Technology #9211), ambos a una dilución 1:300 siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de las MAPKs Fmk1 y Mpk1 se usaron los anticuerpos FUS3 y Mpk1 (Santa Cruz Biotechnology sc-6772 y sc-6802, respectivamente), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control de carga se usó el anticuerpo monoclonal α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology sc-69971). Tras las incubaciones con los anticuerpos se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST.

RESULTADOS

5. Papel del transporte de amonio en la represión de las funciones de virulencia.

Partiendo de la observación previa de que el amonio actúa como regulador negativo de las funciones de virulencia en *F. oxysporum* nos preguntamos primero si su transporte y utilización eran necesarios para el mecanismo represor. Estudios en varias especies de hongos como *S. cerevisiae*, *C. albicans*, o *Fusarium fujikuroi* (Marini *et al.*, 1997, Teichert *et al.*, 2008, Biswas & Morschhäser, 2005) demuestran un importante papel de la proteína transmembrana Mep2/MepB como transportador de amonio y también como un sensor de amonio relacionado con el crecimiento filamentoso en *S. cerevisiae* (Lorenz & Heitman, 1998). En *C. albicans* se ha demostrado mediante deleciones parciales de Mep2, que el dominio citoplasmático localizado en el extremo carboxilo de la proteína está relacionado con la activación del crecimiento filamentoso de manera independiente al transporte de amonio. El ortólogo en *F. fujikuroi*, MepB está relacionado con la regulación del metabolismo secundario de bicaverinas y giberelinas, además de la ruta de señalización TOR (Teichert *et al.*, 2008). Todos estos resultados, unidos a la represión de las funciones de virulencia por amonio en *F. oxysporum* (López-Berges *et al.*, 2010) nos sugerían que MepB podría ser un buen candidato para estudiar la relación entre el transporte de amonio y la regulación de las funciones de virulencia en *F. oxysporum*.

5.1. Identificación y mutación del gen *mepB* (FOXG_00462)

La búsqueda en la base de datos del genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/) se realizó mediante un análisis Blast utilizando la secuencia de aminoácidos de MepB de *F. fujikuroi* (CAJ44734). La búsqueda identificó tres proteínas, una de ellas una supuesta permeasa de amonio y las otras dos proteínas hipotéticas, con un elevado nivel de identidad a MepB (entre 80% y 66%). La proteína que mostraba el mayor grado de identidad, (FOXG_00426), se consideró como el probable ortólogo de MepB de *F. fujikuroi*, deduciendo que las otras dos proteínas podrían corresponder a MepA y MepC que habían sido descritas como permeasas de amonio de importancia secundaria en *F. fujikuroi* (Teichert *et al.*, 2008).

Con el fin de conocer el papel de MepB en *F. oxysporum*, se construyeron mutantes nulos mediante transformación la cepa silvestre con una construcción en la que se había reemplazado la fase abierta de lectura de FOXG_00426 (a partir de ahora denominado *mepB*) por el casete de resistencia a higromicina B (Figura 11A). El análisis Southern confirmó la presencia de una única copia del alelo mutado demostrando que la banda de hibridación de 4Kb de la estirpe silvestre (wt) había sido sustituida por otra de 8.5Kb en los

mutantes en los que se había producido un suceso de recombinación homóloga (Figura 11B).

Para complementar el mutante $\Delta mepB$ se amplificó un fragmento de 5,0Kb (cebadores MepBF + MepBR) que contiene el alelo silvestre de *mepB*, y se utilizó para cotransformar protoplastos de $\Delta mepB$ junto con el casete de resistencia a fleomicina. Los transformantes se crecieron en medio mínimo suplementado con 25 mM de nitrato de amonio, y aquellos que mostraron un crecimiento silvestre se analizaron mediante PCR con los cebadores *mepB met* y *mepB Stop* (Figura 11A). La presencia de una banda de 2Kb indica la incorporación del gen *mepB* intacto ($\Delta mepB+mepB$) Figura 11C.

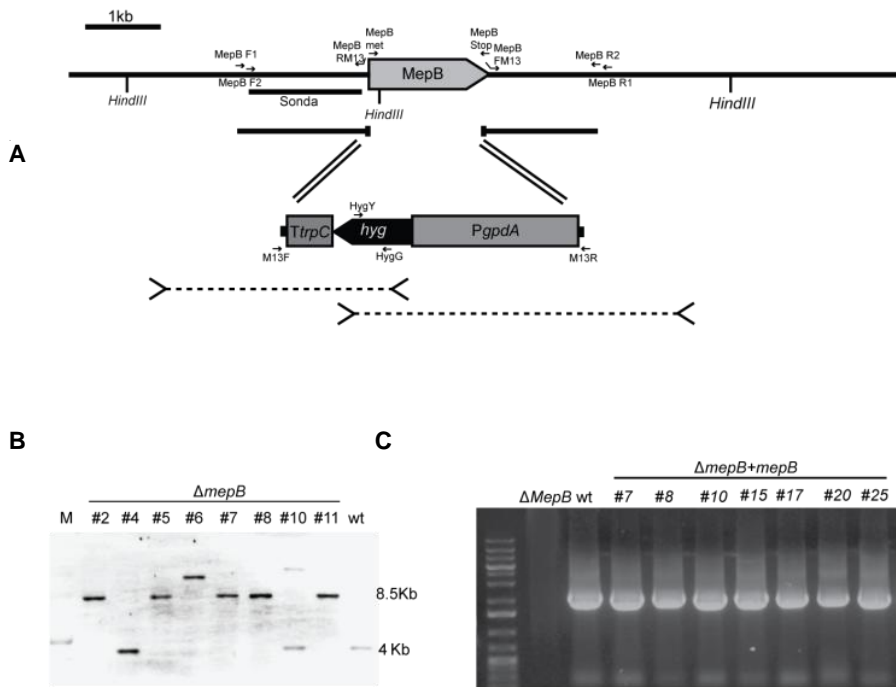


Figura 11. delección del gen *mepB*. **A.** Representación esquemática del locus *mepB* y los fragmentos utilizados para la delección dirigida obtenidos por PCR de fusión (líneas de puntos). **B.** Análisis de los transformantes resistentes a higromicina mediante hibridación Southern; el ADNg de las cepas fue tratado con *HindIII*, separado en un gel de 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada en A. La banda de 8.5Kb indica un suceso de recombinación homóloga y la banda de 4Kb indica la presencia del alelo *mepB* silvestre. **C.** Análisis de los cotransformantes resistentes a fleomicina mediante PCR con los cebadores específicos *mepBmet* y *mepBStop* indicados en A.. La banda de 2Kb indica la presencia del alelo *mepB* silvestre. wt= silvestre. M= marcador.

5.2. MepB necesario para la utilización del amonio

Nos dispusimos a estudiar el papel de MepB en el metabolismo del nitrógeno. Para ello realizamos un ensayo comparativo de crecimiento en medios con diferentes fuentes de nitrógeno incluyendo también el mutante *meaB*, caracterizado anteriormente, que presentaba deficiencias de crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno y estaba afectado en la expresión de gen *mepB* (López-Berges *et al.*, 2010).

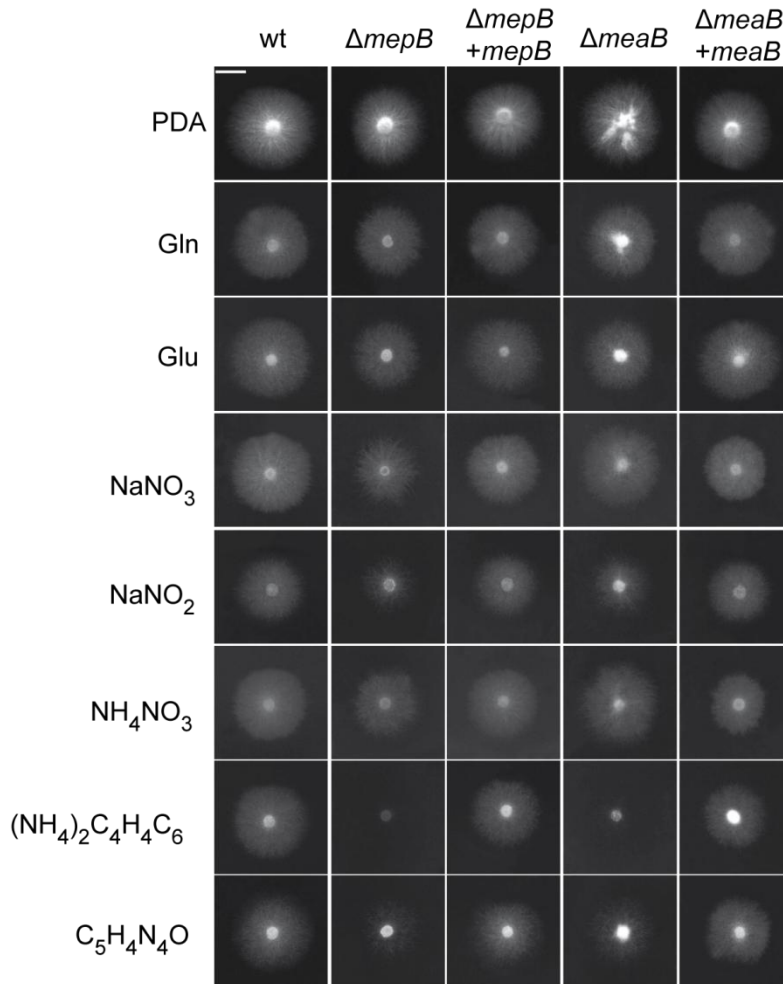


Figura 12. Efecto de la delección de *mepB* y *meaB* en la utilización de fuentes de nitrógeno. Crecimiento de las cepas indicadas en distintas fuentes de nitrógeno. Todos los ensayos, excepto PDA, se realizaron en medio mínimo suplementado con la fuente de nitrógeno indicada: 25mM glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), $NaNO_3$, NH_4NO_3 , tartrato de amonio $((NH_4)_2 C_4H_4C_6)$ o 10 mM hipoxantina ($C_5 H_4N_4O$) o $NaNO_2$. Las placas se incubaron durante tres días. La barra corresponde a 1 cm. wt= cepa silvestre.

Como se observa en la Figura 12 el mutante $\Delta mepB$ presenta un crecimiento normal en PDA y en medio mínimo suplementado con glutamina, sin embargo, se observa una

reducción notable del crecimiento en los medios que contienen amonio como fuente de nitrógeno (NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{C}_6$). El crecimiento del mutante se restauró por completo tras volverle a introducir el alelo *mepB* silvestre ($\Delta\text{mepB}+\text{mepB}$). Estos resultados sugieren que MepB juega un papel importante en la utilización del amonio. De forma inesperada el mutante ΔmepB también presenta un crecimiento reducido en otras fuentes de nitrógeno diferentes al amonio como, NaNO_2 , o hipoxantina y en menor medida ácido glutámico y NaNO_3 .

5.3. MepB contribuye de forma minoritaria a la infección de plantas

A continuación se estudió el papel de MepB en la infección de plantas de tomate. También se incluyó el mutante ΔmeaB , en el que ya se había descrito un leve retraso en la infección (López-Berges *et al.*, 2010).

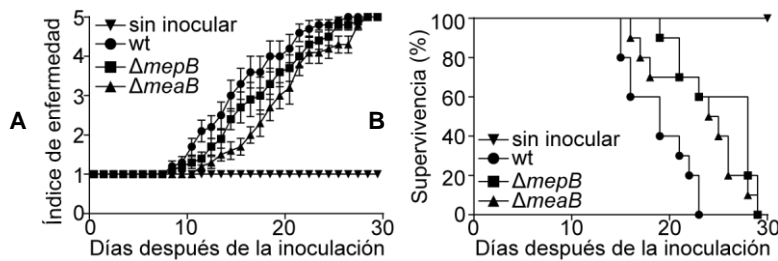


Figura 13. MepB y MeaB tienen un papel minoritario en la infección de plantas de tomate. **A.** Grupos de 10 plantas se inocularon sumergiendo las raíces en una suspensión de 5×10^6 microconidias mL^{-1} de las cepas indicadas. La severidad de los síntomas fue evaluada diariamente utilizando un índice en que el 1 equivale a planta sana y 5 a planta muerta. **B.** Supervivencia de plantas de tomate inoculadas con las cepas indicadas en las mismas condiciones que en las descritas anteriormente.

Como puede observarse en la Figura 13 ambos mutantes muestran un leve retraso en la infección, siendo este retraso un poco más acusado en la cepa ΔmepB . Al analizar la supervivencia de las plantas (Figura 13B), se comprobó que las plantas inoculadas con ΔmepB y ΔmeaB mostraron una mortalidad significativamente reducida en comparación las infectadas con la cepa silvestre (wt) según el análisis Kplan-Meier. No se observaron diferencias significativas entre los mutantes.

Tabla 14 .Valores P obtenidos en el ensayo de infección de plantas de tomate. N.S.= No significativo ($p > 0.05$).

	wt	ΔmepB	ΔmeaB
wt	Ø		

$\Delta mepB$	0.0018	\emptyset	
$\Delta meaB$	0.0071	N.S.	\emptyset

5.4. La represión de las funciones de virulencia por amonio requiere MepB.

Una vez demostrado que MepB no es esencial para la virulencia, nos propusimos analizar si MepB es necesario para la represión mediada por amonio de las funciones relacionadas con la virulencia como la invasión del celofán y la aglutinación de hifas. Como control negativo se utilizó el mutante $\Delta meaB$ previamente descrito como afectado en la represión por amonio (López-Berges *et al.*, 2010).

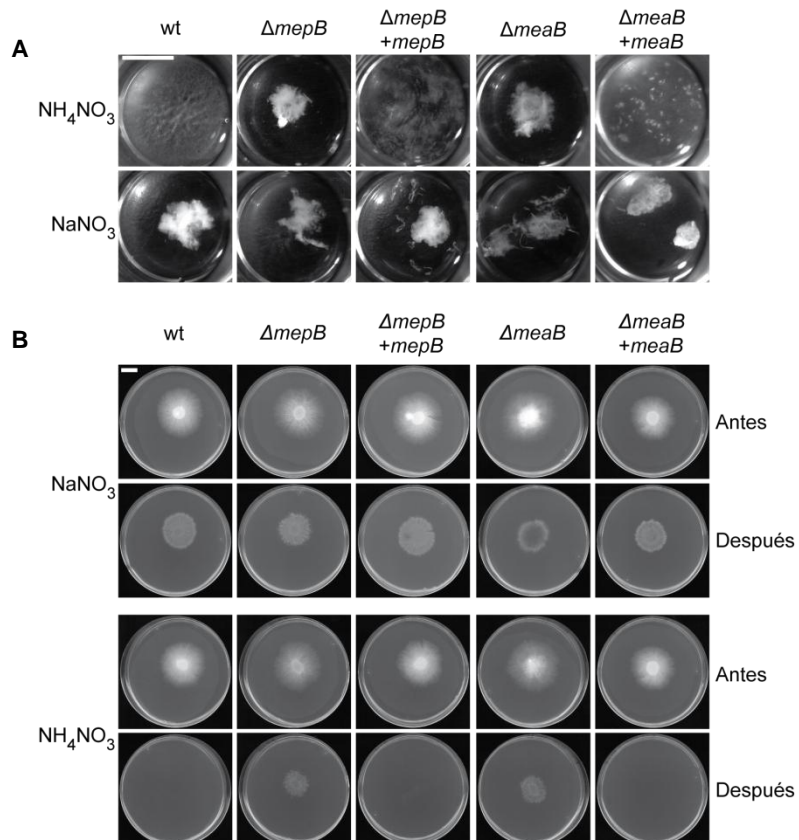


Figura 14. La represión por el amonio de la aglutinación de hifas y la penetración del celofán requiere MepB. **A.** Se inocularon 10^3 esporas de las cepas indicadas en PBD diluido 1:50 en agua suplementado con 25 mM de la fuente de nitrógeno indicada y se incubaron durante 36 horas. Se fotografiaron los agregados de hifas con ayuda de una lupa. La barra corresponde a 1 cm. **B.** Se inocularon 5×10^4 esporas de la cepa indicada en placas de medio mínimo suplementados con 50 mM de la fuente de nitrógeno indicada, cubiertas con una membrana de celofán, y se incubaron a 28°C durante 4 días (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). La barra corresponde a 1 cm.

Como se observa en la Figura 14A, el mutante $\Delta mepB$, al igual que el mutante $\Delta meaB$, forma agregados de hifas incluso en presencia de amonio. En ambos mutantes, la complementación con el alelo silvestre restablece la represión de dichas funciones por amonio.

Así mismo, en ausencia de amonio (NaNO_3) todas las cepas son capaces de atravesar el celofán (Figura 14B), mientras que en presencia de amonio (NH_4NO_3) la invasión se reprime en la cepa silvestre (wt) y en los complementados, pero no en los mutantes $\Delta mepB$ y $\Delta meaB$, que siguen penetrando, a pesar de presentar un crecimiento algo reducido.

Estos resultados indican que MepB es necesario para la represión por amonio de la invasión de celofán y para la formación de agregados de hifas. Ya que MepB es una supuesta permeasa de amonio, la explicación más probable de estos resultados es que el transporte de amonio al interior celular es necesario para que se produzca la represión de dichas funciones. Por otro lado, MeaB funciona como activador transcripcional de *mepB* (López-Berges *et al.*, 2010), lo que explicaría que los fenotipos de los dos mutantes son muy similares en todos los ensayos realizados

6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el pH

6.1. Consecuencias del uso de la fuente de nitrógeno en el balance de protones

Una vez demostrado que MepB está involucrado en el metabolismo del nitrógeno y en la represión por amonio de las funciones de virulencia, nos dispusimos a analizar las consecuencias de la utilización de distintas fuentes de nitrógeno en el balance de protones. La idea se basó en estudios previos en *S. cerevisiae* en los que se demostró que la utilización de distintas fuentes de nitrógeno produce la alcalinización o la acidificación del medio (Castrillo *et al.*, 1995, Palková *et al.*, 2002).

Para comprobar si *F. oxysporum* acidifica o alcaliniza el medio al utilizar distintas fuentes de nitrógeno, se realizó un ensayo de crecimiento en placas con la cepa silvestre y los mutantes $\Delta meaB$ y $\Delta mepB$ en medio mínimo con 25 mM de NH_4NO_3 y suplementado con dos indicadores de pH que abarcan rangos de pH distintos: el morado de bromocresol y verde de bromocresol (Figura 15A).

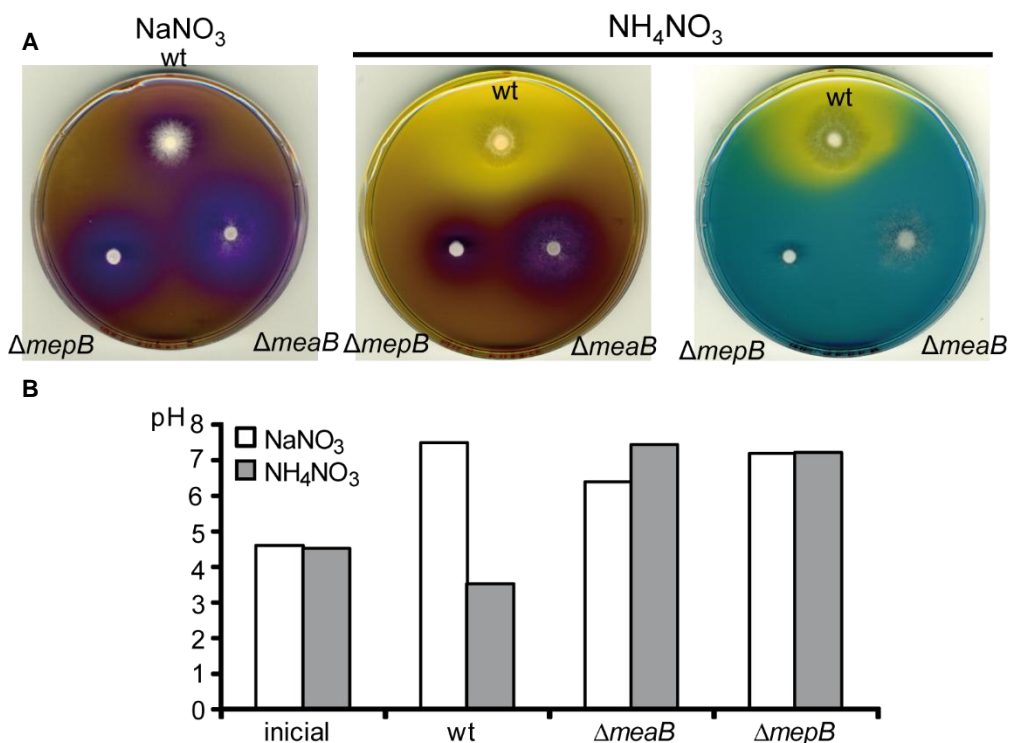


Figura 15. Efecto diferencial de la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el pH del medio. **A.** Se inocularon 2×10^4 esporas de las cepas indicadas en placas con medio mínimo suplementado con 25 mM de NH_4NO_3 o NaNO_3 , según se indica, como fuente de nitrógeno y se incubaron durante tres días a 28 °C. Izquierda y centro: placa suplementada con púrpura de bromocresol. El color morado indica un pH igual o superior a 6,8 y el amarillo indica un pH igual o inferior a 5,2. Derecha: placa suplementada con verde de bromocresol. El color azul indica un pH igual o superior a 5,4 y el color amarillo un pH igual o inferior a 3,8. **B.** Representación del pH antes (inicial) y tras el ensayo de aglutinación con las cepas indicadas en las condiciones descritas en la Figura 14A.

En línea con los resultados publicados en *S. cerevisiae*, la cepa silvestre de *F. oxysporum* acidificó el medio en presencia de amonio (Figura 15A. color amarillo). Sin embargo, los mutantes $\Delta mepB$ y $\Delta meaB$ produjeron el efecto opuesto, una alcalización del medio (color morado). Por otro lado, en ausencia de amonio tanto la cepa silvestre como los distintos mutantes alcalinizaron el medio (color morado).

También se estudió la evolución del pH en función de la fuente de nitrógeno en medio líquido durante el ensayo de aglutinación de hifas.

Como puede observarse en la Figura 15B, al iniciar el ensayo el medio presentó un pH similar en NaNO_3 y en NH_4NO_3 . Tras la incubación en ausencia de amonio (NaNO_3) todas las cepas incrementaron el pH del medio. Sin embargo, en presencia de amonio (NH_4NO_3) la cepa silvestre acidificó el medio mientras que los mutantes (ΔmeaB y ΔmepB) lo alcalinizaron.

Es probable que la diferencia entre las cepas se deba a la incapacidad de los mutantes ΔmepB y ΔmeaB de transportar el amonio, por lo que se ven forzados a utilizar la fuente secundaria nitrato, cuyo transporte conlleva una subida de pH. Para investigar esta hipótesis, propusimos un ensayo en el que comparamos el consumo de amonio de la cepa silvestre frente al de los mutantes ΔmeaB y ΔmepB . Al mismo tiempo, se monitorizó el pH del medio. Se germinaron microconidios de las distintas cepas en PDB, se transfirieron las germinulas a medio mínimo suplementado con 5 M de NH_4NO_3 y se tomaron alícuotas del sobrenadante a determinados tiempos para medirles la concentración de amonio y el pH (Figura 16).

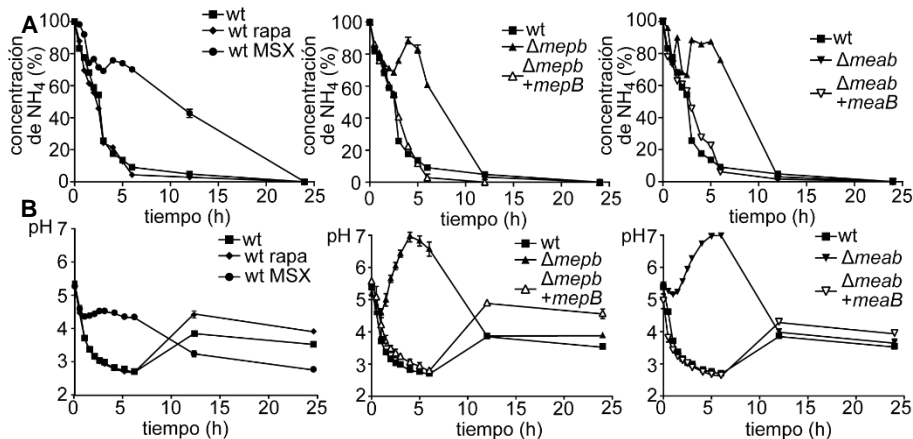


Figura 16. MepB es necesario para el transporte del amonio y la consiguiente acidificación del medio. Se germinaron 10^9 esporas de las cepas indicadas germinadas en PDB y se transfirieron a medio mínimo suplementado con 5 mM de NH_4NO_3 y, en casos indicados, suplementado con un inhibidor específico de la glutamina sintetasa (MSX) o de la proteína quinasa TOR (rapamicina). A los tiempos indicados se recogieron alícuotas del sobrenadante, a las que se les determinó la concentración de amonio **A.** y el pH **B.**

La cepa silvestre (wt) consumió rápidamente el amonio del medio (Figura 16A). El uso del amonio iba acompañado de una rápida acidificación del medio hasta alcanzar un pH inferior a 3 tras seis (Figura 16B). Tras acabarse el amonio en el medio, el pH volvió a subir, debido probablemente al transporte del nitrato como fuente secundaria de nitrógeno. Los mutantes ΔmepB y ΔmeaB mostraron un retraso considerable en el uso del amonio y en la acidificación del medio, debido probablemente, al uso del nitrato como fuente de nitrógeno. A tiempos más tardíos, tanto el transporte de amonio como la acidificación se activaron en los mutantes. Es posible que este fenómeno se deba a la activación de las otras permeasas de

amonio minoritarias, cifradas por los genes *mepA* y *mepC*, tal como se había descrito en *F. fujikuroi* (Teichert *et al.*, 2008). Consumo de amonio y acidificación se restablecieron en los mutantes tras la complementación con el alelo silvestre (Figura 16).

En su conjunto estos datos sugieren que existe una relación causal entre el transporte de amonio y la acidificación del medio.

Previamente se había descrito que inhibidores de la glutamina sintetasa, MSX, o de la proteína quinasa TOR, rapamicina, anulaban el efecto represor del amonio sobre las funciones relacionadas con la virulencia (López-Berges *et al.*, 2010). Quisimos comprobar si este efecto se debe a la interferencia de estos inhibidores con el transporte de amonio. Observamos que tras inhibir la glutamina sintetasa con MSX se bloquea el consumo de amonio (Figura 16A) y con ello la acidificación del medio (Figura 16B). Este resultado nos indicó que cuando el amonio no se incorpora en la ruta de la glutamina sintetasa para formar glutamina, se acumula en el interior celular, se bloquea el transporte de amonio y con ello la acidificación del medio. A tiempos largos ambos procesos volvieron a activarse, probablemente debido a la degradación del inhibidor MSX y la reactivación de la glutamina sintetasa.

Sin embargo, al inhibir el complejo de señalización TOR por la acción de rapamicina, no observamos ningún cambio en el transporte de amonio hacia el interior celular, y por lo tanto no se acidificó el medio. Este resultado nos indicó que la ruta TOR no regulaba el transporte de amonio.

6.2. El pH y no la fuente de nitrógeno regula las funciones de virulencia

La correlación estrecha entre el transporte de amonio y la acidificación del medio nos llevó a formular la hipótesis que el factor clave que regula las funciones de virulencia en *F. oxysporum* es el pH y no la fuente de nitrógeno. Por ello repetimos los ensayos de penetración de celofán y de la aglutinación de hifas en presencia y ausencia de amonio, tamponando esta vez el pH del medio. Para ello utilizamos Mes, un tampón que abarca un rango de pH entre 5 y 7 (Figura 17).

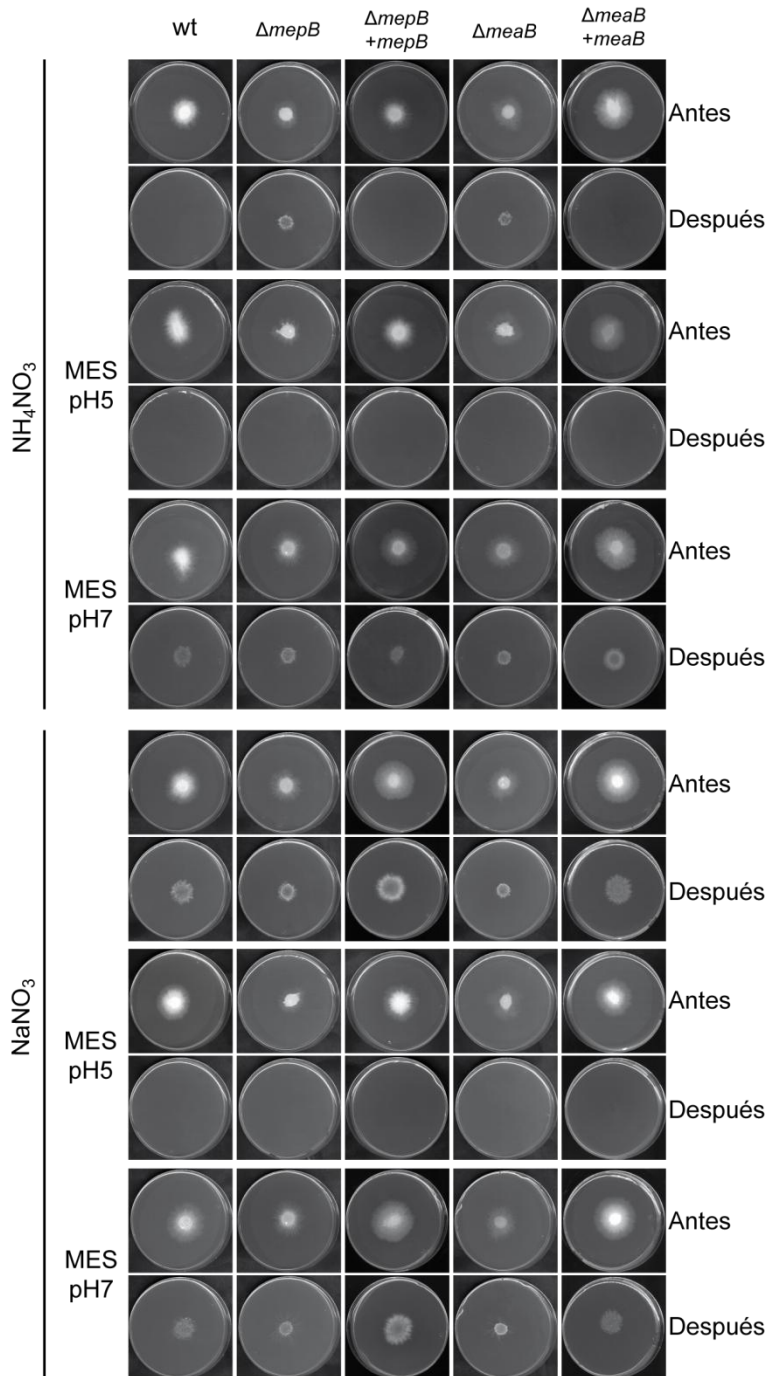


Figura 17. El pH y no la fuente de nitrógeno regula el crecimiento invasivo en membranas de celofán. Se inocularon 5×10^4 esporas de la cepa indicada en placas de medio mínimo cubiertas con una membrana de celofán, suplementados con 50 mM de la fuente de nitrógeno indicada y con 100 mM de tampón MES ajustado a pH 7 o 5, y se incubaron a 28 °C durante 4 días (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).

Como era de esperar todas las cepas penetraron en ausencia de amonio, mientras que en su presencia sólo penetraron los mutantes $\Delta mepB$ y $\Delta meaB$. Sin embargo, al tamponar y ajustar el pH del medio a 5 (MES pH5) ninguna cepa fue capaz de penetrar independientemente de la fuente de nitrógeno. Por otro lado, las cepas penetraron, independientemente de la fuente de nitrógeno, cuando el pH del medio se tamponó y se ajustó a pH 7 (MES pH7) (Figura 17). De hecho en un medio estándar como el PDA, el cambio de pH de 7 a 5 fue suficiente para inhibir la penetración del celofán (Figura 18). Estos resultados demuestran que es el pH, y no la fuente de nitrógeno, el factor clave que regula la invasión del celofán.

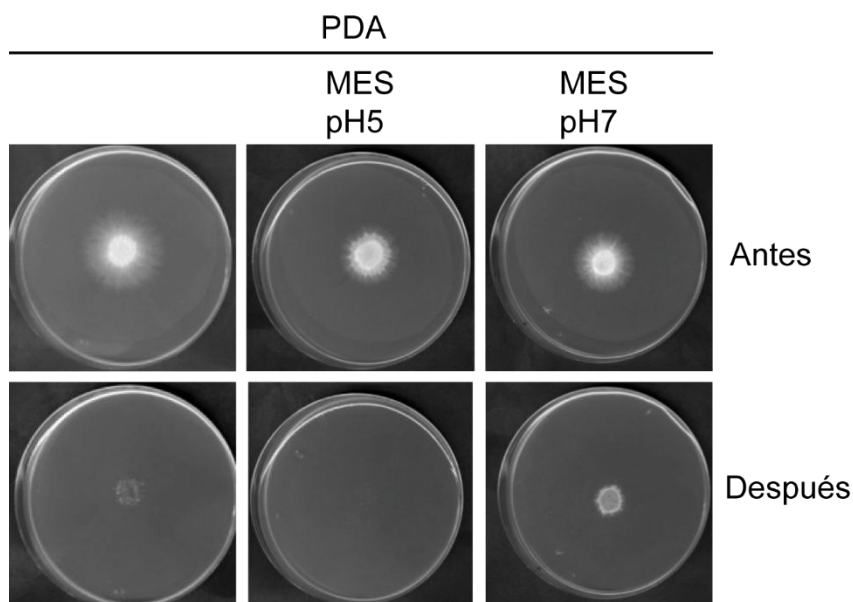


Figura 18. El pH regula el crecimiento invasor en *F. oxysporum*. Se inocularon 5×10^4 esporas de la cepa silvestre en placas de PDA cubiertas con una membrana de celofán, suplementados con 100 mM de tampón MES ajustado a pH 7 ó 5, y se incubaron a 28 °C durante 2 días (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y se incubaron un día más para determinar la presencia del hongo en el medio (después).

Un segundo fenotipo relacionado con la virulencia y reprimido en presencia de amonio es la aglutinación de hifas (López-Berges *et al.*, 2010), Para analizar si el pH también regula este proceso, se realizó un ensayo de aglutinación de hifas con las distintas cepas en medio tamponado y el pH ajustado a 5 y a 7.

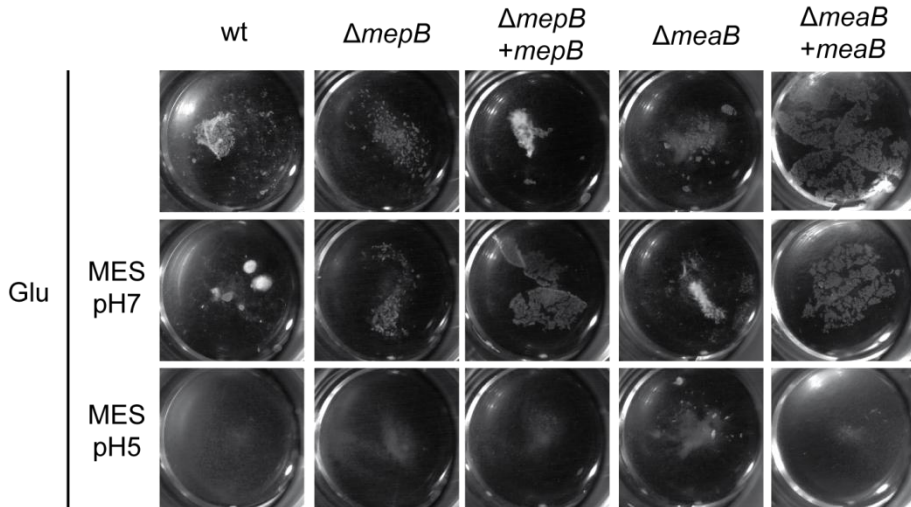


Figura 19. El pH regula la aglutinación de hifas. Se inocularon 10^3 esporas de las cepas en PDB diluido 1:50 en agua suplementado con 25 mM de ácido glutámico ajustado a pH 5 ó 7 y tamponado con MES 100mM, y se incubaron a 28 °C durante 36 horas.

Todas las cepas formaron agregados de hifas a pH 7 pero no a pH 5 (Figura 19). Por tanto la aglutinación de hifas también está regulada por pH.

Los resultados obtenidos nos llevaron a plantear que si el pH actúa como regulador de las funciones de virulencia en *F. oxysporum*, podría ser también un factor clave durante la infección de planta. Para comprobar dicha hipótesis realizamos un ensayo estándar de infección de raíces de tomate con la cepa silvestre, donde las plantas se regaron con agua tamponada a pH 5 ó 7 o con agua sin tamponar como control.

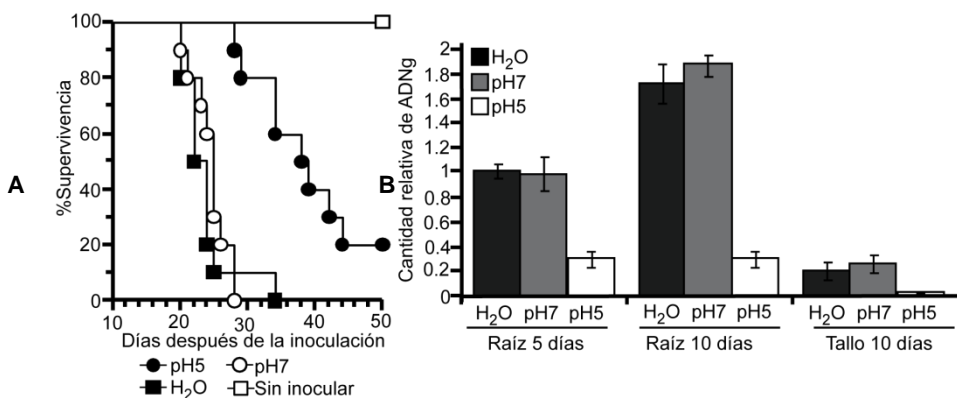


Figura 20. El pH es un factor clave en la regulación de la infección de *F. oxysporum* en plantas de tomate. A. Grupos de 20 plantas se inocularon con una suspensión de esporas de la cepa silvestre al pH indicado y se regaron diariamente con agua suplementada con MES 1 mM ajustado a pH 5 ó 7, o con agua sin tamponar. Se muestra la supervivencia de las plantas a lo largo del tiempo. El gráfico muestra los resultados de un experimento representativo. **B.** Cuantificación de la biomasa fúngica en plantas infectadas. PCR cuantitativa a tiempo real realizada con ADN total extraído de raíz o tallo de plantas infectadas a los 5 o 10 días después de la inoculación. Las barras de error muestran la desviación típica de dos experimentos independientes con tres replicas técnicas cada uno. La PCR fue realizada por el Dr. Manuel Sánchez López Berges.

En la Figura 20A, se aprecia que la infección con *F. oxysporum* avanzó mucho más lentamente a pH 5 que a pH 7 o en agua. A pH 5 no llegaron a morir todas las plantas incluso a los 50 días. Por el contrario, las plantas regadas con agua tamponada a pH 7 estaban todas muertas alrededor de los treinta días, tiempo al que más de la mitad de las plantas regadas con agua a pH 5 seguían vivas. La reducción de la mortalidad a pH 5 fue altamente significativa ($p < 0.0001$).

La cuantificación, por PRC cuantitativa a tiempo real, de la biomasa del hongo en raíz y tallo de las plantas infectadas reveló una correlación elevada con el índice de mortalidad (Figura 20B). Así, se detectó significativamente menos cantidad de hongo en raíz y en tallo de plantas regadas con agua tamponada a pH 5 comparado con las regadas a pH 7. Estos resultados apuntan a un papel importante del pH en la patogénesis de *F. oxysporum*.

El hecho de que las plantas regadas con agua sin tamponar mostraran un desarrollo de la infección parecido al de las plantas mantenidas a pH 7, indicaba que el pH fisiológico durante la infección podría estar cerca de ese valor. En efecto, aunque inicialmente el agua tenía un pH cercano a 5.5, al medir el pH al día siguiente, se observó que había aumentado en una unidad. En vista de estos resultados quisimos investigar si la subida del pH durante la infección de raíces podría estar asociada con la presencia del hongo. Microconidios de *F. oxysporum* se incubaron en agua junto con raíces de planta de tomate, y se midió el pH cada dos horas. Como controles se incubaron también el hongo y la planta solos.

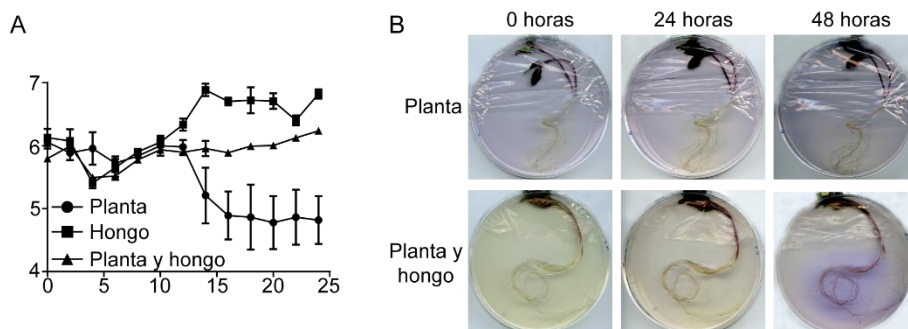


Figura 21. *F. oxysporum* alcaliniza el medio durante la infección de raíces de tomate. **A.** Tubos con 5 mL de PDB diluido 1:50 se inocularon con 5×10^7 esporas de la cepa silvestre en ausencia (Hongo) o en presencia de las raíces sumergidas de tres plantas (Planta y hongo). Como control se sumergieron raíces de 3 plantas sin hongo (Planta). Los tubos se incubaron a 28 °C y con agitación (170 rpm), y se midió el pH del medio a los tiempos indicados. **B.** Grupos de dos raíces de plantas se sumergieron en 3 mL de top agar con 3×10^7 esporas de la cepa silvestre (Planta y chongo) o sin esporas (Planta), suplementado con púrpura de bromocresol. El color morado indica un pH igual o superior a 6.8 y el color amarillo un pH igual o inferior a 5.4. Las placas se escanearon a los tiempo indicados.

La capacidad acidificadora de las raíces ha sido descrita anteriormente (Römheld *et al.*, 1984). En Figura 21A, se muestra que la raíz de tomate en ausencia del hongo produce una bajada del pH extracelular de más de una unidad. Sin embargo, la acidificación se anula al incubar la raíz en presencia de *F. oxysporum*, e incluso se observa un ligero aumento de pH del medio. En ausencia de la raíz, el hongo también produce un incremento del pH extracelular.

El mismo ensayo se realizó en medio sólido, sumergiendo las raíces de planta de tomate en top agar agua con indicador de pH en ausencia o presencia de esporas de *F. oxysporum*. En la Figura 21B se aprecia una acidificación alrededor de la raíz en ausencia de hongo (Planta), mientras que en su presencia (Planta y hongo) se produce una alcalinización en la zona cercana a la raíz. En su conjunto estos resultados demuestran que *F. oxysporum* es capaz de inducir activamente la alcalinización del medio durante la infección de la raíz.

6.3. El pH regula el nivel de fosforilación de distintas MAPKs

Todas las funciones de virulencia reguladas por el pH, tal como la invasión del celofán, la aglutinación de hifas o la infección de la planta, requieren la MAPK Fmk1 (Di Pietro *et al.*, 2001, Prados-Rosales & Di Pietro, 2008). Por tanto nos preguntamos si el control del pH sobre dichas funciones se ejerce a través de la regulación de Fmk1. El estado de activación de una MAPK depende de su nivel de fosforilación en los residuos ser/threo (Payne *et al.*, 1991) nivel que puede medirse mediante un anticuerpo específico de la versión fosforilada.

Se diseñó un experimento para determinar el efecto del pH sobre el nivel de fosforilación de Fmk1. Esporas de la cepa silvestre se germinaron en PDB tamponado a pH 7, se bajó el pH a 5 durante treinta minutos y después se volvió a aumentarlo durante otros treinta minutos. A los distintos tiempos se tomaron alícuotas de micelio, de las cuales se obtuvieron extractos de proteínas que se analizaron mediante western blot (Figura 22A).

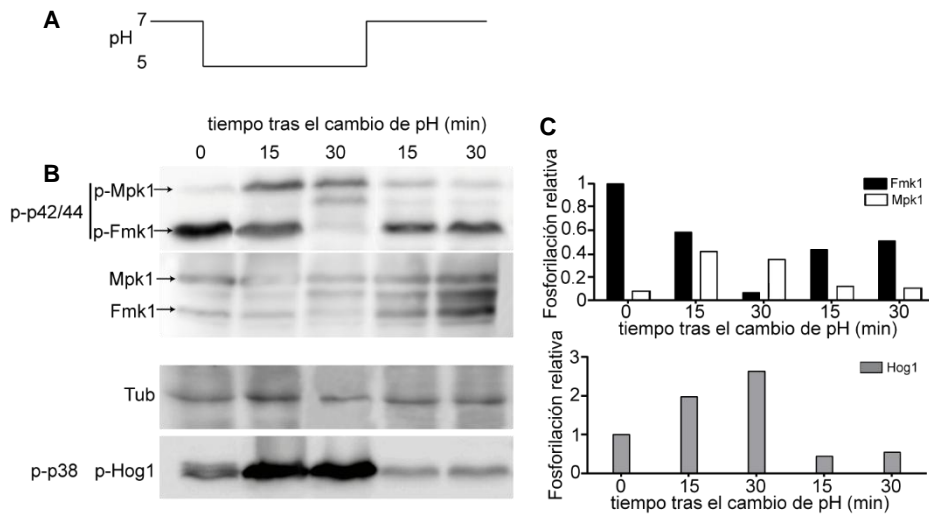


Figura 22. El pH regula el nivel de fosforilación de las tres MAPKs de *F. oxysporum*, Fmk1, Mpk1 y Hog1. **A.** Representación esquemática del experimento de cambio de pH. Esporas de la cepa silvestre se germinaron durante 15 horas en PDB tamponado a pH 7 con MES 100mM (tiempo 0). Transcurrido ese tiempo se bajó el pH del medio a 5 añadiendo HCl y se recogieron alícuotas de micelio a los 15 y 30 minutos. Después se volvió a subir el pH a 7 añadiendo NaOH y se recogieron alícuotas a los 15 y 30 minutos. **B.** Western blots realizados con los extractos proteicos totales de los micelios recogidos a los tiempos indicados e hibridados con los siguientes anticuerpos: anti-phospho-p42/44 (detecta p-Mpk1 y p-Fmk1); anti-Mpk1, anti-Fus3; anti- α -tubulina (control de carga); anti-phospho-p38 (detecta p-Hog1). **C.** Cuantificación de la señal correspondiente a cada una de las bandas de MAPKs mediante el software Multi-Gauge. Los valores se normalizaron con la tubulina, y se tomó como referencia el valor de Fmk1 o de Hog1 a tiempo 0.

En la Figura 22B y C se observa que el nivel de fosforilación de la MAPK Fmk1 responde a cambios de pH en el medio. A pH 7 (tiempo 0), Fmk1 se encuentra altamente fosforilada, pero al bajar el pH del medio a 5, el nivel de fosforilación disminuye rápidamente. Al volver a subir el pH a 7, Fmk1 se vuelve a fosforilar de forma rápida.

De forma inesperada, se observó que la otra MAPK de *F. oxysporum* detectada por el anticuerpo anti-phospho-42/44, la ortóloga de la MAPK de integridad celular Mpk1/Slf2 de *S. cerevisiae*, también cambia el nivel de fosforilación en respuesta a pH (Figura 22B y C). Sin embargo, al contrario de Fmk1, Mpk1 se fosforila rápidamente a pH bajo y se desfosforila a pH alto, mostrando, por tanto, un patrón opuesto al de Fmk1.

A parte de Fmk1 y Mpk1, *F. oxysporum*, posee una tercera MAPK, Hog1, que regula la ruta de estrés hiperosmótico. Por lo tanto, se realizó un análisis western con los extractos proteicos, hibridando con el anticuerpo anti-phospho-p38, que reconoce específicamente Hog1 en estado fosforilado.

Hog1 respondió a los cambios de pH del mismo modo que Mpk1, mostrando un rápido aumento de fosforilación a pH 5 y un rápido descenso a pH 7 (Figura 22B y C)

7. Búsqueda de proteínas que median la fosforilación de las MAPKs en respuesta a pH en *F. oxysporum*.

Una vez relacionado el pH con la fosforilación de las distintas MAPKs en *F. oxysporum*, continuamos nuestra investigación buscando componentes celulares que puedan mediar esta respuesta. Recientemente, se ha descrito que Msb2 y Sho1, dos proteínas transmembrana que contribuyen a la fosforilación de Fmk1 y el crecimiento invasor de *F. oxysporum* (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011, Perez-Nadales & Di Pietro, 2014). Dado que los cambios de pH ocurren en el medio extracelular, quisimos estudiar el papel de Msb2 y Sho1 como posibles receptores de membrana de la señal mediada por pH.

Por otro lado se había descrito el factor de transcripción PacC como componente en la respuesta a pH alcalino en *F. oxysporum* (Caracuel *et al.*, 2003) y en otros hongos filamentosos (Tilburn *et al.*, 1995) por lo que se consideró como posible componente en la regulación de las MAPKs por el pH extracelular.

7.1. Sho1, Msb2 y PacC: su papel en fosforilación de Fmk1.

El papel de estas tres proteínas en la fosforilación de las distintas MAPKs se estudió utilizando los mutantes de pérdida de función $\Delta sho1$, $\Delta msb2$ y $\Delta pacC$, previamente creados por las Dras. Elena Pérez Nadales y Zaira Caracuel, respectivamente. Primero se determinó la capacidad de los mutantes de penetrar el celofán a distintos pHs (Figura 23)

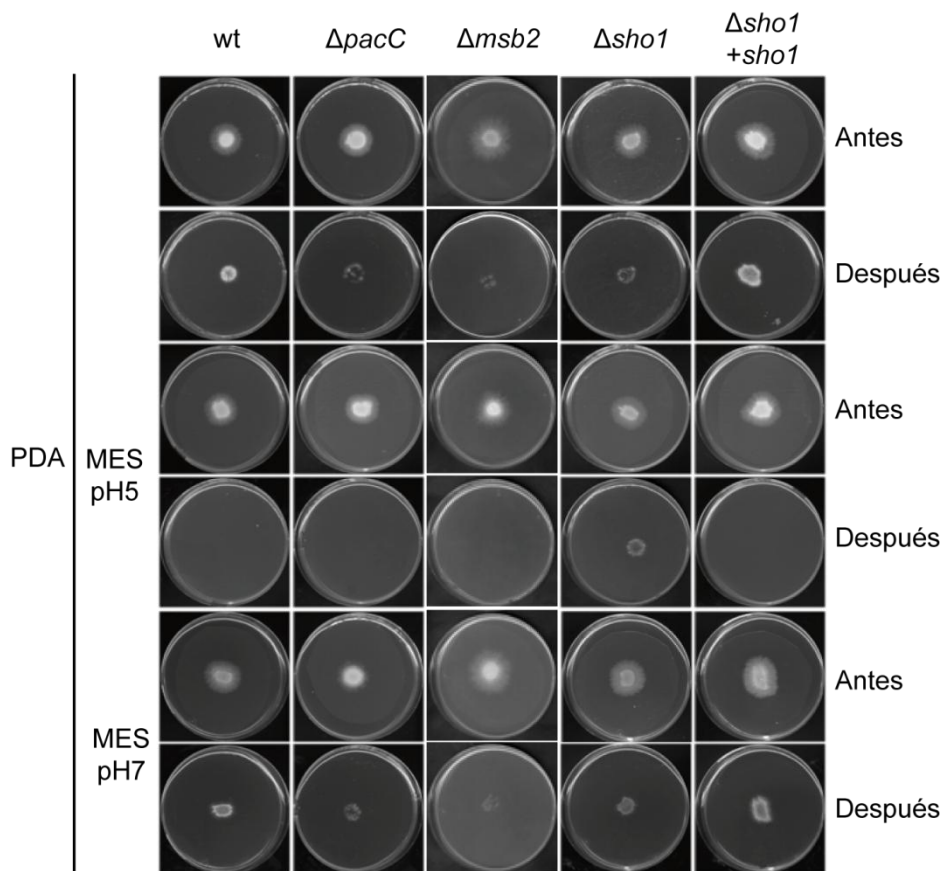


Figura 23. Sho1 contribuye a la represión del crecimiento invasivo a pH ácido. Ensayo de penetración del celofán realizado según se detalla en la Figura 17. Las cepas indicadas se inocularon en placas PDA. En los casos indicados, el medio se suplementó con MES 100mM ajustado a pH 5 ó 7.

Todas las cepas estudiadas penetraron el celofán en PDA sin ajustar pH o con el pH ajustado a 7. Los tres mutantes presentaron un crecimiento invasivo reducido, que ya se había descrito anteriormente para $\Delta msb2$ y $\Delta sho1$ (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011, Perez-Nadales & Di Pietro, 2014). Sin embargo, con el medio tamponado a pH 5 sólo el mutante $\Delta sho1$ fue capaz de penetrar (Figura 23).

Estos resultados corroboran la idea de que el pH regula el crecimiento invasivo y no la fuente de nitrógeno. Por otro lado, estos datos indican que la proteína Sho1, descrita como un regulador positivo de Fmk1 y del crecimiento invasor (Perez-Nadales & Di Pietro, 2014) podría tener un papel específico en la inhibición de la invasión a pH ácido.

Se estudió el papel de Msb2 y Sho1 en la fosforilación de las MAPKs, realizando un análisis western blot a distintos pHs con las estirpes $\Delta sho1$ y $\Delta msb2$.

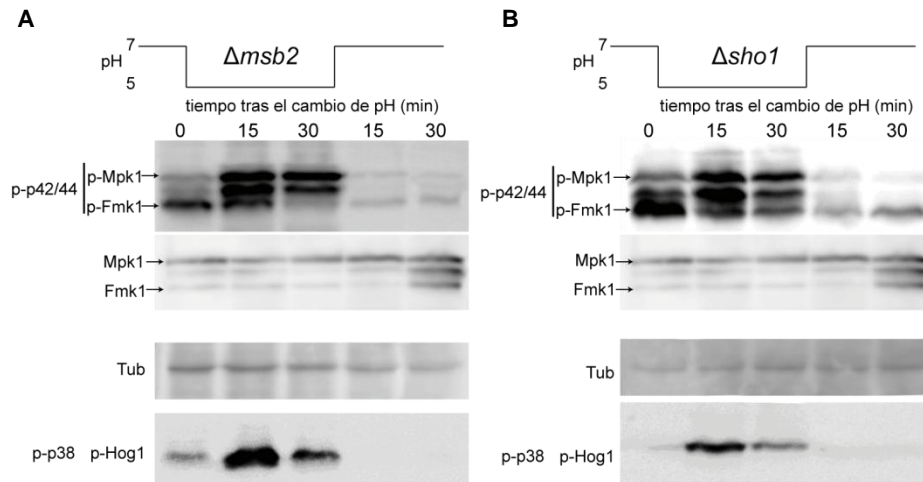


Figura 24. Sho1 es necesario para la desfosforilación completa de Fmk1 inducida por pH ácido. Western blots realizados con las cepas indicadas en las condiciones descritas en la Figura 22

En la Figura 24 se observa que en el mutante $\Delta msb2$ la MAPK Fmk1 se desfosforila totalmente tras la acidificación a pH 5, al igual que se observó en la cepa silvestre (ver Figura 22). Sin embargo en el mutante $\Delta sho1$ Fmk1 no llega a desfosforilarse completamente, incluso tras 30 minutos a pH 5 (Figura 24B). Por otro lado, al restaurar el pH del medio a 7, en ambos mutantes la fosforilación de Fmk1 es claramente reducida comparada con la cepa silvestre. Por tanto, Msb2 y Sho1 contribuyen a la fosforilación de Fmk1, tal como se había descrito anteriormente (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011, Perez-Nadales & Di Pietro, 2014). Además, estos resultados sugieren que Sho1, pero no Msb2, tiene un papel hasta ahora desconocido en la desfosforilación de Fmk1 a pH bajo. Esta idea concuerda con la observación anterior que el mutante $\Delta sho1$ es capaz de penetrar el celofán incluso a pH 5 (Figura 23).

Por otra parte ni Mpk1 ni Hog1 muestran diferencias significativas frente a la cepa silvestre en el patrón de fosforilación a distintos pHs, pudiéndose deducir que Msb2 y Sho1 no median la respuesta de fosforilación de Mpk1 y Hog1 al cambio de pH.

7.2. Mpk1 y Hog1 intervienen en la desfosforilación de Fmk1 en respuesta a pH ácido.

El patrón de fosforilación contrario de Mpk1 y Hog1 frente a Fmk1 en respuesta a pH (ver Figura 22) indica un posible efecto cruzado entre las distintas MAPKs. Quisimos, por tanto, estudiar el papel de las MAPKs Mpk1 y Hog1 en los cambios de fosforilación de Fmk1.

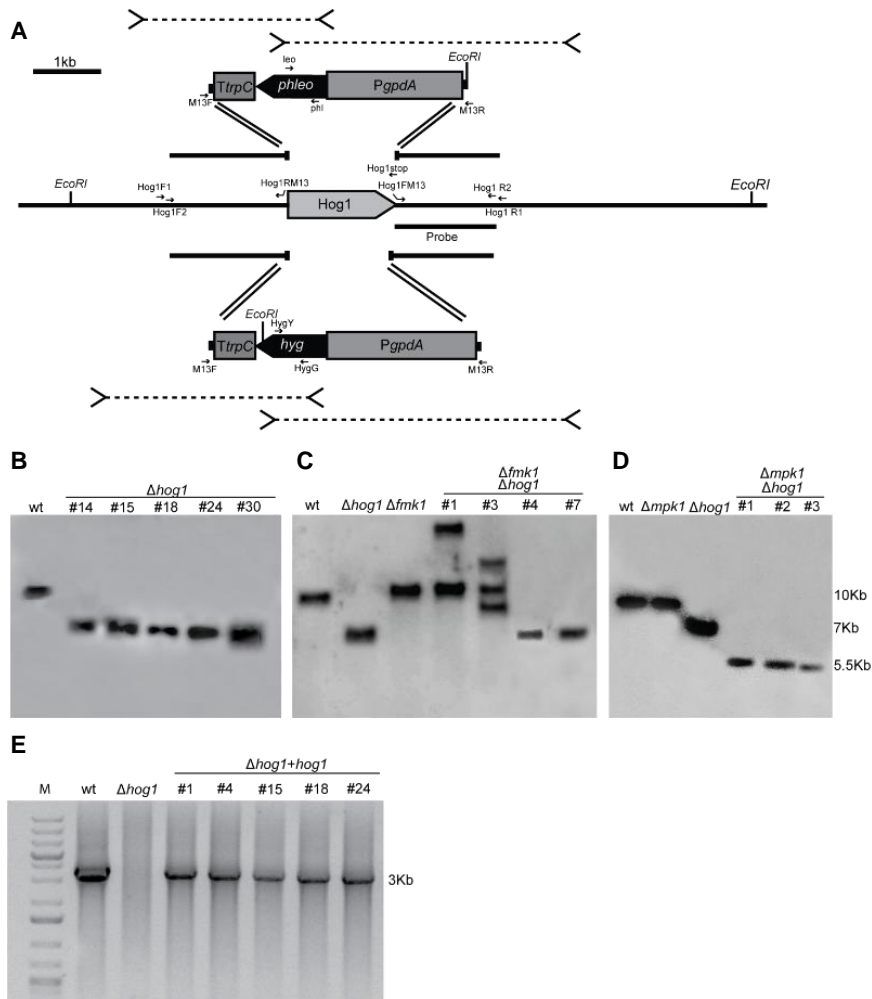
Para ello, era necesario obtener mutantes en las diferentes MAPKs. El mutante $\Delta fmk1$ ya había sido descrito anteriormente (Di Pietro *et al.*, 2001), y los mutantes $\Delta mpk1$ y $\Delta fmk1\Delta mpk1$ han sido creados recientemente en el laboratorio por el Dr. David Turrà. Para completar la colección, nos propusimos la obtención de los mutantes $\Delta hog1$, $\Delta fmk1\Delta hog1$ y $\Delta mpk1\Delta hog1$.

7.2.1. Identificación e interrupción génica el gen *hog1* (FOXG_03618).

La búsqueda Blastp en la base de datos del genoma de *F. oxysporum* con la secuencia control la secuencia de aminoácidos de Hog1 de *S. cerevisiae* (S000004103) identificó un supuesto ortólogo, FOXG_03618, que mostraba una identidad del 91% con Hog1 de *S. cerevisiae*.

El mutante $\Delta FOXG_03618$ se construyó mediante la transformación de la cepa silvestre con una construcción en la que se había reemplazado la fase abierta de lectura del gen FOXG_03618 (a partir de ahora denominado *hog1*) por el casete de resistencia a higromicina (Figura 25A). Con la misma construcción se transformaron protoplastos de la cepa $\Delta fmk1$ para crear el mutante doble $\Delta fmk1\Delta hog1$. Para crear la cepa $\Delta mpk1\Delta hog1$ se transformaron protoplastos de la cepa $\Delta mpk1$ con una construcción en la que se había reemplazado la fase abierta de lectura del gen *hog1* por el casete de resistencia a fleomicina (Figura 25A). El análisis Southern del ADN de los transformantes tratado con EcoRI confirmó, que en los mutantes la banda de hibridación de 10 Kb correspondiente al alelo *hog1* silvestre (wt) había sido sustituido por otra de 7 Kb mediante un suceso de recombinación homóloga en los mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta fmk1\Delta hog1$ y fue sustituida por otra de 5.5 Kb en los mutantes $\Delta mpk1\Delta hog1$ (Figura 25).

Para complementar al mutante $\Delta hog1$ se amplificó un fragmento de 5,0Kb que contenía el alelo silvestre del gen *hog1*, utilizando los cebadores Hog1F1 + Hog1R2, y se utilizó para cotransformar protoplastos del mutante $\Delta hog1$ junto con el casete de resistencia a fleomicina. Los transformantes se transfirieron a medio mínimo con 0.5 M de NaCl y aquellos que mostraron un crecimiento silvestre se analizaron mediante (con Hog1F2 y Hog1 Stop) (Figura 25A). La presencia de una banda de 3Kb indica la incorporación del alelo *hog1* silvestre ($\Delta hog1+hog1$) (Figura 25E).



A. Representación esquemática del locus *hog1* y de los fragmentos utilizados para la delección dirigida mediante la técnica *Split Marker* (líneas discontinuas). **B, C y D.** Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; el ADNg de las cepas indicadas fue tratado con *EcoRI*, separado en un gel al 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada en A. **E.** Identificación de mutantes $\Delta hog1$ complementados por análisis PCR con los cebadores Hog1F2 y Hog1Stop. La banda de 3Kb indica la presencia del gen *hog1* silvestre. wt= silvestre. M= Marcador.

7.2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes MAPK.

Con el propósito de confirmar que los genes delecionados correspondían con las MAPKs Mpk1 y Hog1, se realizaron ensayos de crecimiento ante diferentes tipos de estrés en cuya respuesta la importancia de alguna de estas dos MAPKs había sido demostrada en otros hongos (véase apartado 2.1 y 2.2).

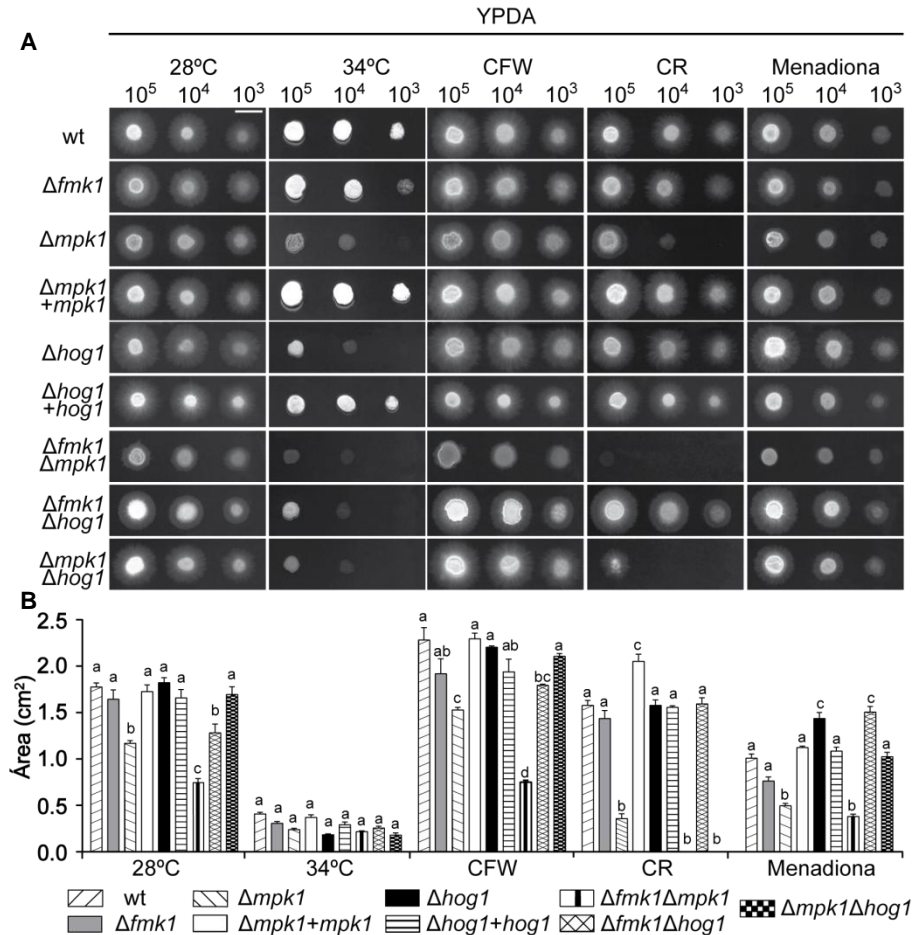


Figura 26. Efecto de la delección individual y combinada de las distintas MAPKs de *F. oxysporum* sobre la respuesta a estrés de temperatura, pared y oxidativo. **A.** Crecimiento de las cepas indicadas en medio YPDA en condiciones de estrés de alta temperatura (34°C), de pared (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Congo red (CR) o 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Calcoflúor White (CFW)) u oxidativo (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ menadiona). Las placas se inocularon con las concentraciones de microconidios indicadas y se incubaron 2 días, excepto YPDA 34 °C que se incubó 4 días. La barra indica un cm. **B.** Cuantificación del área de las colonias mostradas en A (concentración 10⁴), mediante el software Multi-Gauge. Las barras de error representan la desviación típica calculada a partir de 4 colonias. Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según el test de Dunnet de múltiples comparaciones, tomando como referencia la cepa silvestre (wt).

Como puede observarse en la Figura 26A al someter a los distintos mutantes a estrés de temperatura (34 °C), todos crecieron de una manera más restrictiva, siendo el crecimiento mucho menor en los mutantes en los que se a delecionado el *mpk1* o el gen *hog1* tanto de manera simple como simultánea. Sin embargo ese menor crecimiento a 34 °C no resultó significativo cuando se cuantificó el área de la colonia (Figura 26B) seguramente debido a que el software informático cuantifica el área en la que se inocularon los microconidios y no cuantifica intensidad, aunque se parecía una disminución en el crecimiento en los distintos

mutantes. Por otra parte, al someter a los distintos mutantes a estrés de pared (CFW y CR) se aprecia cómo tanto el mutante simple $\Delta mpk1$ como el doble $\Delta fmk1\Delta mpk1$ presentaron un crecimiento reducido comparado con el de la cepa silvestre (wt), siendo más reducido aún el crecimiento del doble mutante (Figura 26A y B). Por último, en presencia de un estrés oxidativo (menadiona), el mutante simple $\Delta hog1$ y el doble mutante $\Delta fmk1\Delta hog1$ presentaron un crecimiento significativamente mayor al de la estirpe silvestre, mientras que el mutante simple $\Delta mpk1$ y el doble mutante $\Delta fmk1\Delta mpk1$ presentan un crecimiento significativamente reducido. Curiosamente el mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ tiene un crecimiento similar a la cepa silvestre Figura 26A y B.

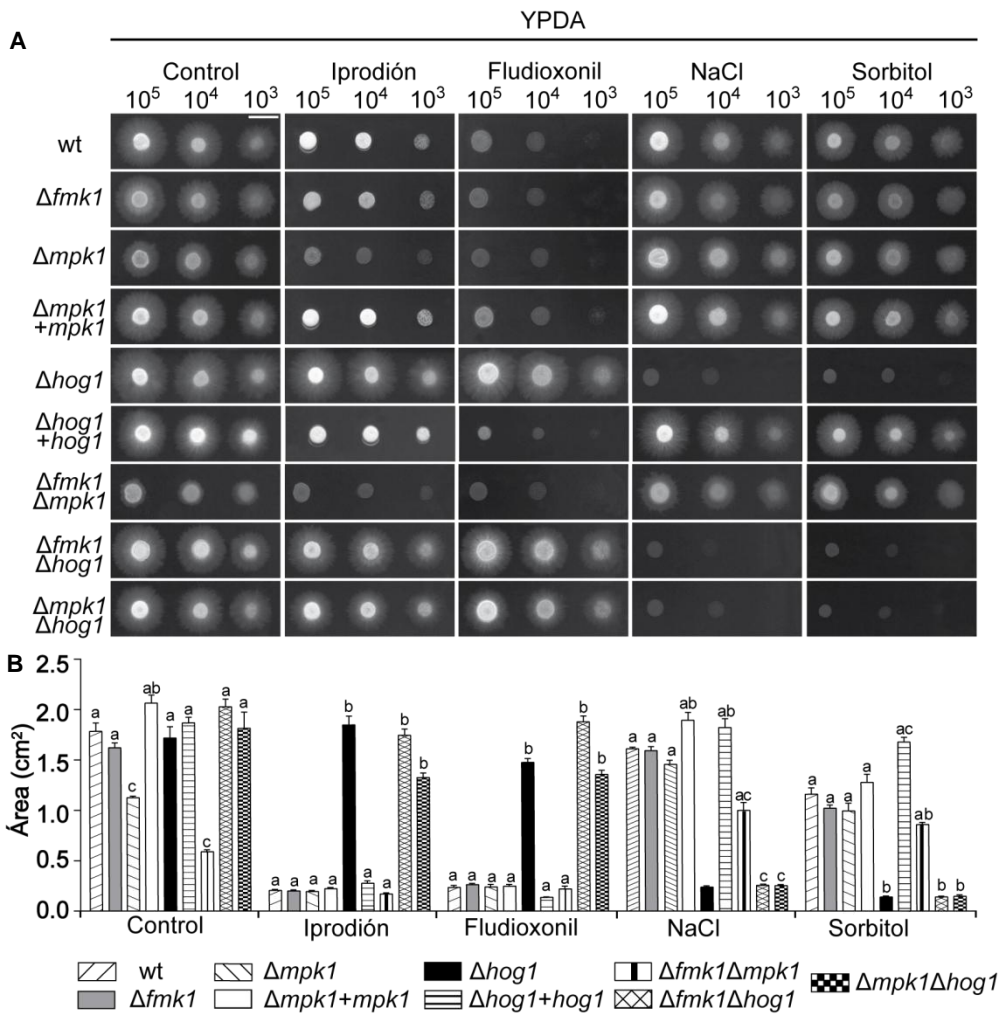


Figura 27. Efecto de la delección individual y combinada de las distintas MAPKs de *F. oxysporum* sobre la respuesta a estrés osmótico y a fungicidas. **A.** Crecimiento de las cepas indicadas en medio YPDA (control) en presencia de fungicidas ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ iprodión o $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fludioxonil) o hiperosmótico (0.4 M NaCl o 1 M sorbitol). Las placas se inocularon con las concentraciones de microconidios indicadas y se incubaron dos días. La barra indica un cm. **B.** Cuantificación del área de las colonias mostradas en A (concentración 10^4), mediante el software Multi-Gauge. Las barras de error representan la desviación típica calculada a partir de 4 colonias. Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($<0,05$) según el test de Dunnet de múltiples comparaciones, tomando como referencia la cepa silvestre (wt)

Como puede observarse en la Figura 27A y B, en respuesta a antifúngicos (iprodión y fludioxonil) sólo los mutantes en los que se ha deleccionado el gen *hog1* presentaron un mayor crecimiento, aunque el modo de acción de estos antifúngicos no está aún muy claro, pero parece ser que hiperactivan la ruta HOG y detienen el crecimiento. En *F. oxysporum* está descrito que el receptor de la cascada de señalización HOG, Fhk1, es resistente a este tipo de antifúngicos (Rispail & Di Pietro, 2010), lo que corroboraría estos resultados. Sin embargo, sucede todo lo contrario al someter a los mutantes a estrés osmótico (NaCl y sorbitol) (Figura 27Ay B) donde los mutantes en los que se ha deleccionado la MAPK Hog1 no crecieron. Sorprendentemente, en respuesta a estrés osmótico el mutante Δmpk1 restaura el crecimiento al crecimiento que tiene la cepa silvestre (wt) Figura 27A y B.

Otro fenotipo que nos pareció interesante investigar fue la producción de enzimas pectolíticas de degradación de ácido poligalacturónico, debido a que la producción de estas enzimas está relacionada con la capacidad de infección.

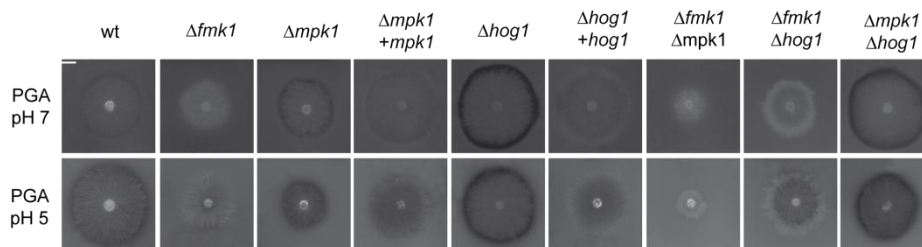
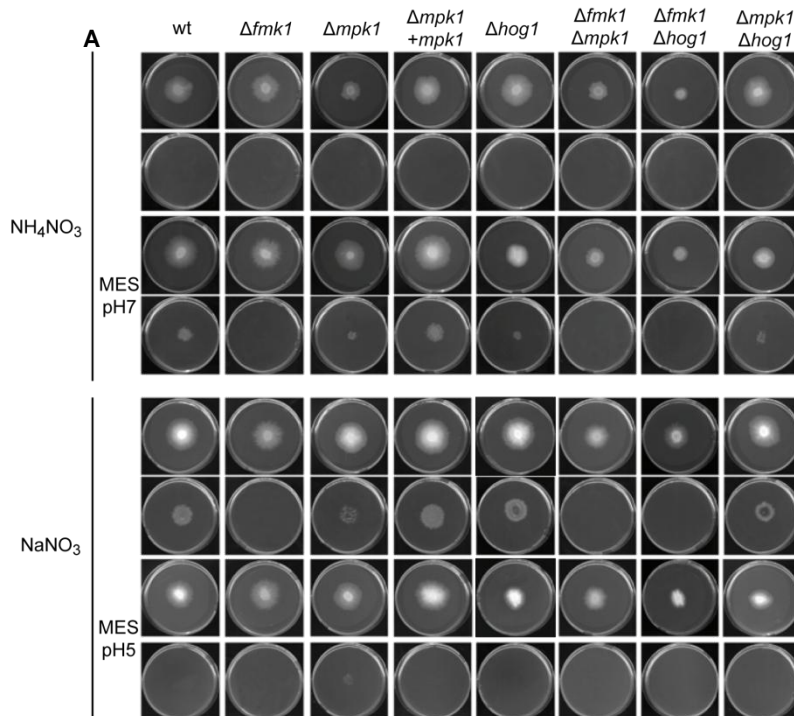


Figura 28. Fmk1 promueve la actividad pectinolítica de *F. oxysporum* mientras Mpk1 y Hog1 la reprimen. **A.** Se inocularon 2×10^5 microconidios de las cepas indicadas en placas con 1% de ácido poligalacturónico y se incubaron durante 4 días a 28°C . Se precipitó el PGA con HCl 0.4 N. La actividad poligalacturonasa se visualizó como un halo oscuro alrededor de la colonia fúngica.

Como puede observarse en la Figura 28A, la cepa silvestre (wt) degrada el ácido poligalacturónico en el medio, tanto a pH 7 como a pH 5, lo que se visualiza como un halo oscuro alrededor de la colonia. Sin embargo, las cepas en las que se ha deleccionado el gen *fmk1* (Δfmk1 , $\Delta\text{fmk1}\Delta\text{mpk1}$ y $\Delta\text{fmk1}\Delta\text{hog1}$) no llevan a cabo la degradación. Por el contrario, los mutantes en los que se ha deleccionado el gen *mpk1* y, sobre todo, el gen *hog1* presentan una mayor degradación del ácido poligalacturónico a ambos pHs (Figura 28). Por tanto, Fmk1

actúa como regulador positivo de la actividad pectinolítica, mientras que Mpk1 y Hog1 actúan como reguladores negativos.

A continuación se determinó el papel de las distintas MAPKs en la penetración del celofán en dos tipos de medios: medio mínimo en ausencia o en presencia de amonio, y medio PDA. En ambos casos se realizó el ensayo también con pH tamponado a 5 ó 7 (Figura 29).



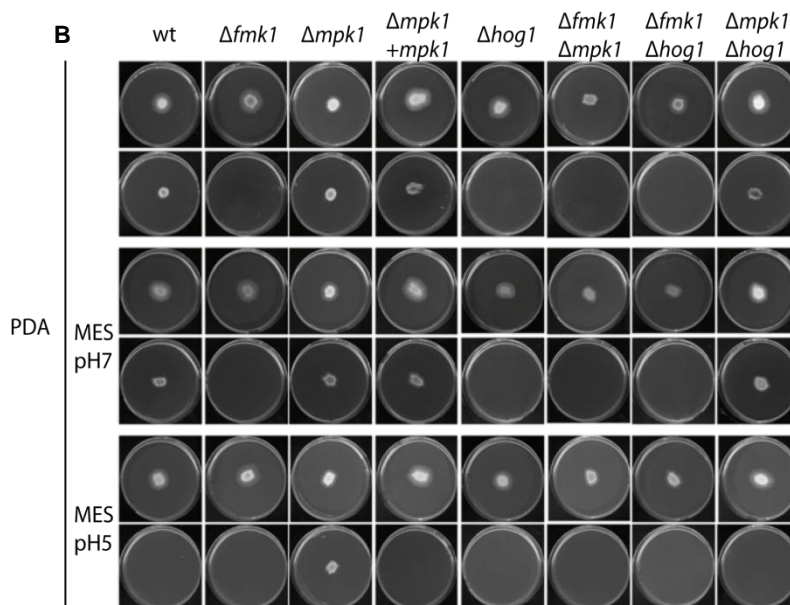


Figura 29. Mpk1 es necesario para la represión del crecimiento invasivo a pH ácido. El ensayo se realizó en las condiciones que se indican en la Figura 17.

En medio mínimo ninguna cepa fue capaz de penetrar el celofán en presencia de amonio (NH_4NO_3). Sin embargo, al tamponar el medio a pH7 (MES pH7) o en ausencia de amonio (NaNO_3), todas las cepas penetraron el celofán exceptuando aquellas que carecen del gen *fmk1* ($\Delta fmk1$, $\Delta fmk1\Delta mpk1$ y $\Delta fmk1\Delta hog1$). La penetración reducida en los mutantes $\Delta mpk1$, $\Delta hog1$ y $\Delta mpk1\Delta hog1$ al tamponar el medio a pH5 (MES pH5) la única cepa capaz de atravesar el celofán fue el mutante $\Delta mpk1$, pero no los dobles mutantes $\Delta fmk1\Delta mpk1$ y $\Delta mpk1\Delta hog1$.

En medio PDA se obtuvieron resultados similares, pero con una diferencia notable. El mutante $\Delta hog1$ no penetró el celofán en ninguna condición. Finalmente, Mpk1 parece tener un papel en la represión de la invasión a pH ácido, ya que el mutante es capaz de penetrar incluso a pH 5.

Estos resultados demuestran que la MAPK Fmk1 cumple una función en el crecimiento invasor, ya que en su ausencia previene la penetración en cualquier condición y fondo genético. Hog1 parece contribuir también a la penetración sobre todo en condiciones en las que los nutrientes son muy abundantes. Para intentar saber que nutrientes estarían afectando en la penetración del mutante $\Delta hog1$, diseñamos un ensayo de celofán en medio mínimo, donde el mutante es capaz de penetrar el celofán, con una cantidad reducida de glucosa y sin glucosa y, además, cambiando el NaNO_3 por casaaminoácidos ya que los aminoácidos son uno de los componentes mayoritarios de fuente de nitrógeno en el PDA, (Beever & Bollard, 1970).

En la Figura 30 podemos observar como la presencia de glucosa hizo que el pH del medio se alcalinizó más lentamente, pero sin embargo los mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta mpk1\Delta hog1$ no fueron capaces de penetrar el celofán, lo que nos indica que la presencia de algunos aminoácidos pueden contribuir a la represión del crecimiento invasor y que esa respuesta sería mediada por Hog1 y además es independiente de la alcalinización del medio. Sin embargo no sabemos qué aminoácidos son los responsables de esta inhibición, hemos probado aminoácidos que están presentes en el PDB en mayor proporción por separado (arginina y glutámico) (Beever & Bollard, 1970) y el mutante $\Delta hog1$ penetró el celofán, lo que nos hace pensar que es la acción sinérgica de dos o más aminoácidos.

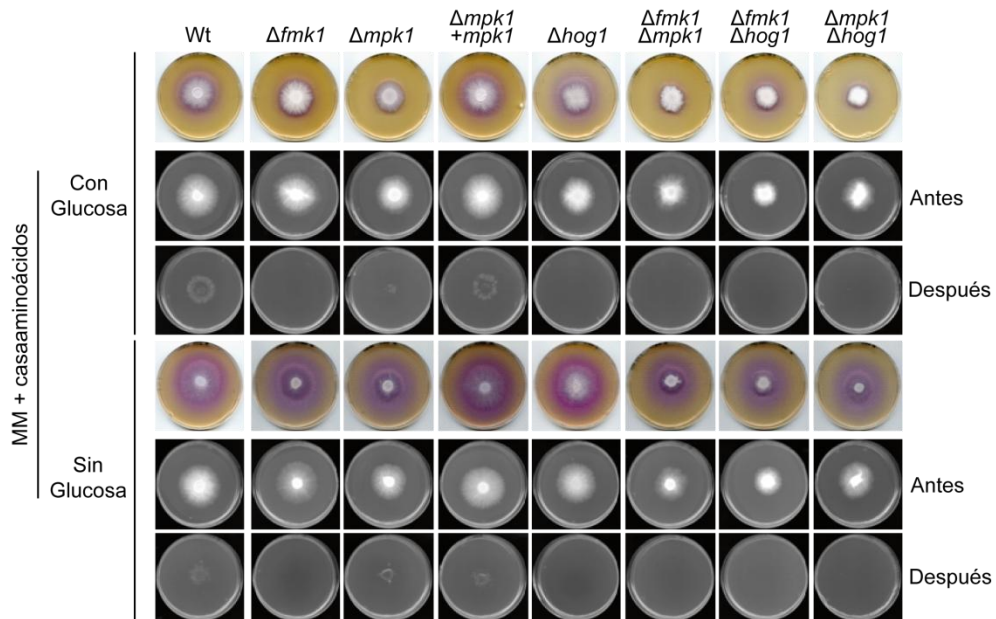


Figura 30. Hog1 contribuye al crecimiento invasivo en presencia de aminoácidos. Se inocularon 5×10^4 esporas de las cepas indicadas en placas de medio mínimo con suplementadas con 2% de casaaminoácidos (p/v) como fuente de nitrógeno, con 0.5% de glucosa (p/v) o sin glucosa y con indicador de pH púrpura de bromocresol cubiertas con una membrana de celofán, y se incubaron a 28 °C durante 4 días (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).

A continuación quisimos comprobar el papel de las MAPKs en la aglutinación de hifas, tanto en presencia como en ausencia de amonio y en medio con ácido glutámico tanto sin tamponar como tamponado a pH 5 ó 7.

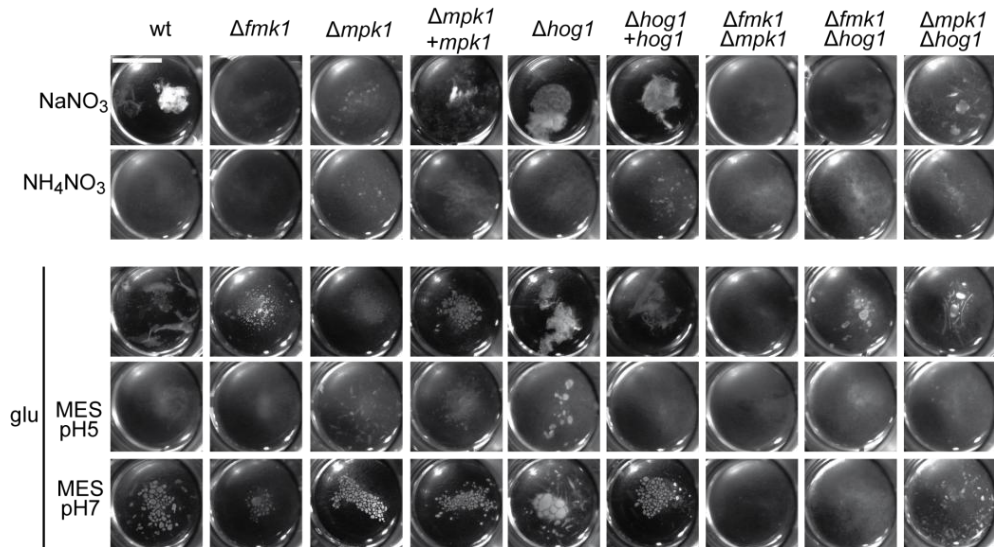


Figura 31. Fmk1 promueve la aglutinación de hifas, mientras que Hog1 la reprime. Se inocularon 10^3 microconidios de las cepas indicadas en PDB diluido en agua 1:50 suplementado con 25mM de la fuente de nitrógeno indicada y, según se indica, con MES 100 mM a pH 5 ó 7y se incubaron a 28 °C durante 36 horas. La barra indica 1 cm. wt= silvestre.

Como se observa en la Figura 31 ninguna cepa forma agregados de hifas en presencia de amonio (NH_4NO_3), sin embargo en su ausencia (NaNO_3) todos los mutantes aglutinan menos aquellos que carecen del gen *fmk1*. Al realizar el ensayo en medio se obtuvo un resultado similar. Todas las cepas excepto en las que carecen de *fmk1* aglutinaron a pH 7, mientras que a pH 5 solo lo hizo Δhog1 . Podemos deducir que el pH alto y Fmk1 fomentan la aglutinación, mientras que el pH ácido inhibe la aglutinación y Hog1 podría estar implicado en esta inhibición.

Un fenotipo clave en *F. oxysporum* es la capacidad de infectar y causar enfermedad en plantas de tomate o en un huésped animal. Estudios previos demostraron que Fmk1 es esencial para la infección de plantas de tomate, pero no para la infección de ratones inmunodeprimidos o larvas de *Galleria* (Di Pietro *et al.*, 2001, Ortoneda *et al.*, 2004, Navarro-Velasco *et al.*, 2011).

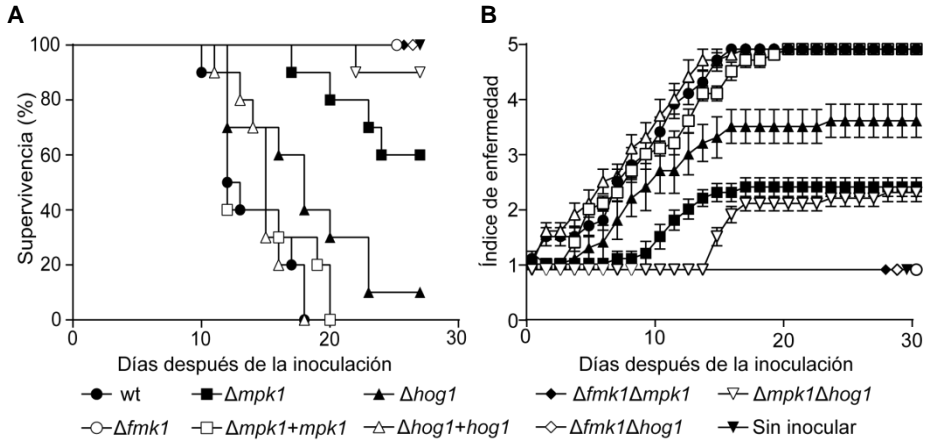


Figura 32. Mpk1 y Hog1 contribuyen de forma aditiva a la virulencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate. Las condiciones del ensayo se describen en la Figura 13.

En la Figura 32 se comprueba la pérdida de virulencia en todos los mutantes que carecen del gen *fmk1* tanto el mutante simple como los mutantes dobles en el gen *fmk1*, tanto simple como los dobles, demostrando que el gen *fmk1* es esencial para la infección de plantas como ya había descrito anteriormente (Di Pietro *et al.*, 2001). El mutante $\Delta hog1$ presenta una reducción parcial aunque significativa en la virulencia ($p = 0.0214$ frente a wt), lo que indica que Hog1 contribuye de forma minoritaria a la infección de planta (Figura 32A y B). Por último, el mutante $\Delta mpk1$ tiene una reducción muy severa en la virulencia ($p < 0.0001$ frente a wt) y dicha reducción es aún más acusada en el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ (Figura 32). El efecto aditivo de Mpk1 y Hog1 indica que las dos MAPKs pueden tener funciones distintas y complementarias durante la infección de plantas.

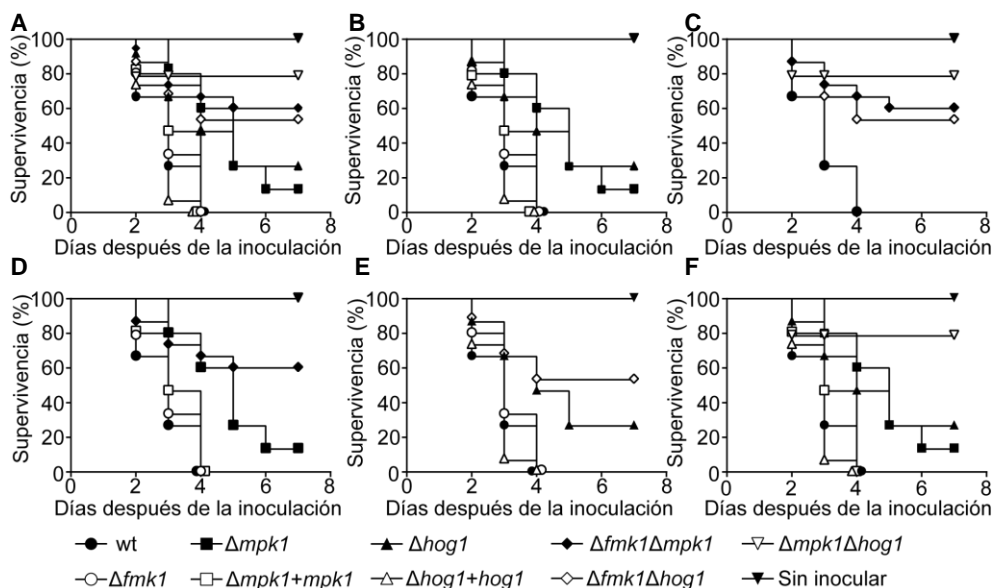


Figura 33. Mpk1 y Hog1 contribuyen de forma aditiva a la virulencia de *F. oxysporum* en *G. mellonella*. Grupos de 20 larvas se inocularon por inyección con $1,6 \times 10^3$ microconidias de las cepas indicadas y se incubaron a 30°C. El porcentaje de supervivencia fue anotado durante 7 días. El experimento se llevó a cabo 4 veces, obteniendo resultados similares. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo.

Como puede observarse en la Figura 33 la cepa silvestre (wt), los complementados ($\Delta mpk1+mpk1$ y $\Delta hog1+hog1$) y el mutante $\Delta fmk1$ infectan y matan a las larvas de *G. mellonella* en 4 días (Figura 33A y B). Los mutantes $\Delta mpk1$ y $\Delta hog1$ tienen una mortalidad significativamente reducida comparado con la cepa silvestre ($p < 0.0001$ y $p = 0.031$, respectivamente), no llegando a matar todas las larvas en siete días (Figura 33B). La reducción de la mortalidad fue significativamente más pronunciada el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ ($p = 0.008$ y $p = 0.0258$ frente a los respectivos mutantes sencillos) (Figura 33D, E y F), y entre el 50 y el 80% de las larvas continuaron vivas al finalizar el ensayo. Este resultado apunta a una función aditiva y complementaria de las distintas rutas MAPK durante la infección de *Galleria*.

7.2.3. Mpk1 y Hog1 contribuyen a la desfosforilación de Fmk1 a pH ácido.

Los resultados del ensayo de penetración del celofán indican que Mpk1 contribuye a la represión del crecimiento invasivo a pH ácido. Por otro lado Hog1 regula negativamente la secreción de enzimas pectinolíticas y la aglutinación, dos procesos dependientes de Fmk1. En vista de estos resultados, realizamos un análisis western blot con el fin de determinar el efecto de la inactivación de los distintos genes MAPK sobre los cambios de fosforilación en respuesta al pH.

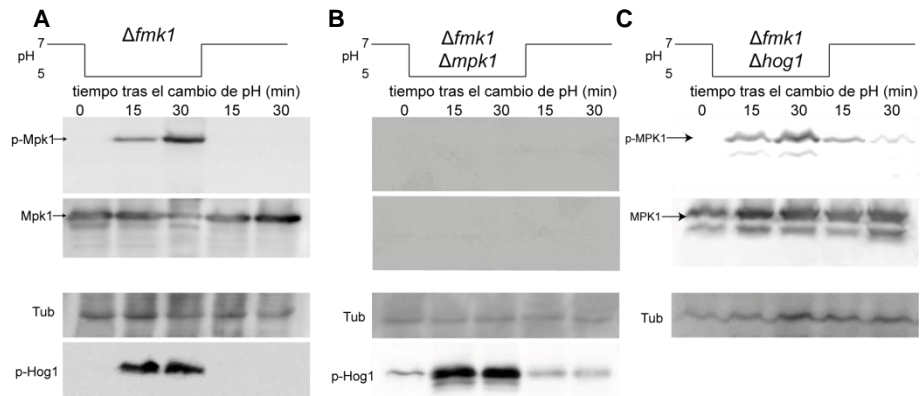


Figura 34. La delección de *fmk1* no afecta el patrón de fosforilación de Mpk1 y Hog1 en respuesta a pH. Western blots realizados con las cepas indicadas en las condiciones descritas en la Figura 22.

La delección de *fmk1* no produjo ningún cambio en el patrón de fosforilación de Mpk1 o de Hog1. Ambas MAPKs se encuentran fosforiladas a pH 5 y desfosforiladas a pH 7 (Figura 34A) al igual que en la cepa silvestre (ver Figura 22)

Al deleccionar los genes *fmk1* y *mpk1* conjuntamente tampoco se modifica el patrón de fosforilación de Hog1 (Figura 34B). Por último, no se aprecia cambio en el patrón de fosforilación en Mpk1 al deleccionar *fmk1* y *hog1* conjuntamente (Figura 34C).

De estos resultados deducimos que Fmk1 no tiene un papel importante en la fosforilación o desfosforilación de Mpk1 y Hog1 en respuesta al pH.

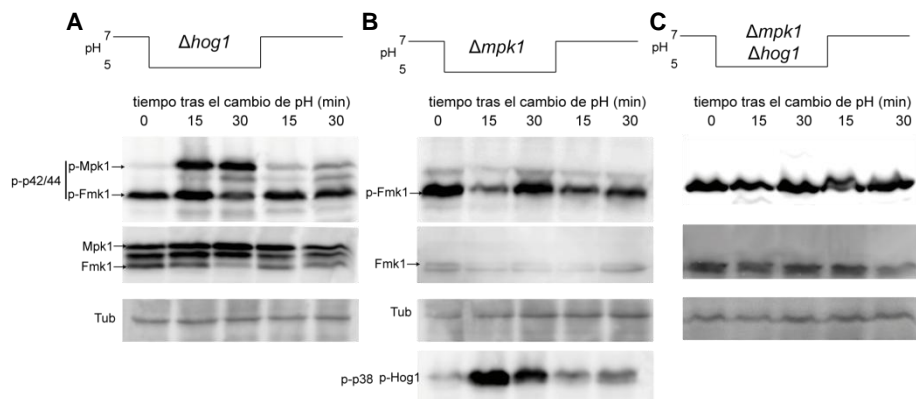


Figura 35. Mpk1 y Hog1 son necesarios para la rápida desfosforilación de Fmk1 inducida por acidificación. Western blots realizados con las cepas indicadas en las condiciones descritas en la Figura 22.

La delección de *hog1* no modifica el patrón de fosforilación de Mpk1 (Figura 35A y B). Sin embargo, tanto el mutante $\Delta mpk1$ como $\Delta hog1$ son incapaces de desfosforilar Fmk1 en

respuesta a la acidificación del medio (en una única MAPK como en las dos MAPKs no desfosforilan a Fmk1 al acidificar el pH del medio (Figura 35A y B). Este fenómeno es aún más acusado en el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ (Figura 35C). Estos resultados sugieren que la desfosforilación de Fmk1 a pH ácido es mediada por Mpk1 y Hog1, posiblemente a través de mecanismos distintos.

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos, se realizó un análisis comparativo del nivel de fosforilación de las tres MAPKs a pH 7 y pH 5 en la cepa silvestre y en todos los mutantes.

La Figura 36 muestra la fosforilación de las distintas MAPKs a pH 7. Mientras en los mutantes simples $\Delta fmk1$, $\Delta mpk1$ y $\Delta hog1$ no se observaron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de las otras MAPKs. En los dobles mutantes se detecta una clara hiperfosforilación de la tercera MAPK. Así, Fmk1 esta hiperfosforilada en el mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ y Hog1 esta hiperfosforilada en el mutante $\Delta fmk1\Delta mpk1$.

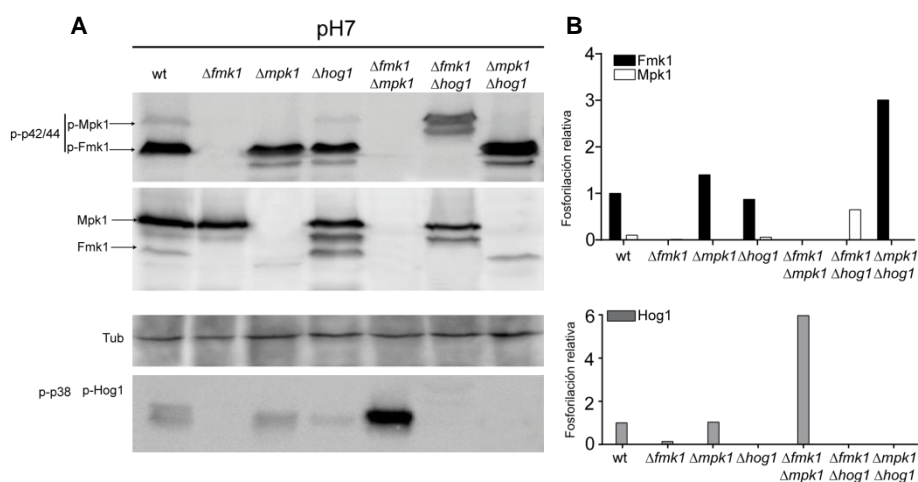


Figura 36. La delección simultánea de dos MAPKs produce la hiperfosforilación de la tercera MAPK. Esporas de las cepas indicadas se germinaron durante 15 horas en PDB a pH7. Los western blot se realizaron **A**, y se cuantificaron **B**, como se describe en la Figura 22.

En la Figura 37 se muestra la fosforilación de las distintas MAPKs a pH 5. A este pH Fmk1 se encuentra desfosforilada en la cepa silvestre, mientras en los mutantes $\Delta mpk1$ y $\Delta hog1$ su nivel de fosforilación es tres veces más alto, y en el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ es hasta 14 veces más alto. Este resultado sugiere que tanto Mpk1 como Hog1 contribuyen a la desfosforilación de Fmk1 a pH ácido. También se observa un papel represor de Hog1 sobre la fosforilación de Mpk1, ya que el mutante $\Delta hog1$ y el doble mutante $\Delta fmk1\Delta hog1$ tienen una mayor fosforilación de esta MAPK comparado con la estirpe silvestre (wt). Por último, se aprecia un papel negativo de Fmk1 sobre la fosforilación de Hog1, ya que el mutante $\Delta fmk1$

muestra una mayor fosforilación de esta quinasa. Cabe destacar que el doble mutante $\Delta fmk1\Delta mpk1$ muestra un nivel muy elevado de fosforilación de Hog1 (10 veces superior al silvestre).

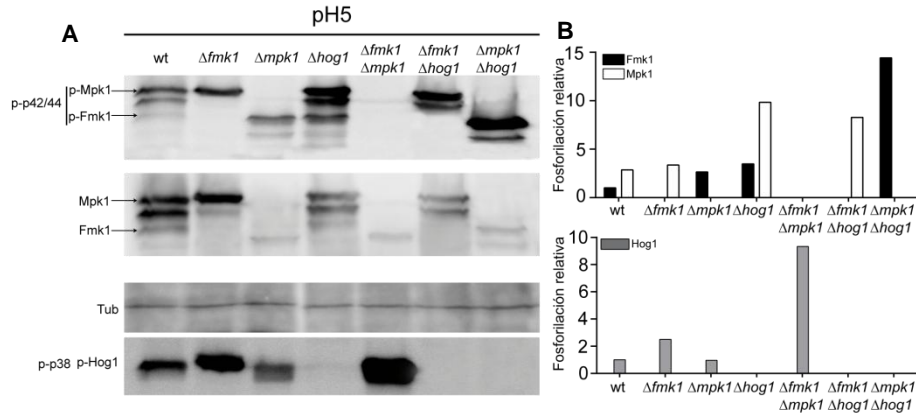


Figura 37. Mpk1 y Hog1 contribuyen a la desfosforilación de Fmk1 inducida por pH ácido. Esporas de las cepas indicadas se germinaron durante 15 horas en PDB a pH7, después se bajó el pH del medio a 5 y se incubó 30 minutos. Los western blot se realizaron **A.** y se cuantificaron **B.** como se describe en la Figura 22

En su conjunto, estos resultados demuestran la presencia de una regulación cruzada entre las distintas rutas MAPK, donde, por lo general, una determinada MAPK inhibe la activación de la otra ruta.

Para comparar los niveles de fosforilación de las MAPKs de los receptores Msb2 y Sho1 realizamos el mismo tipo de western con los mutantes $\Delta msb2$ y $\Delta sho1$ y además incluimos los mutantes $\Delta fmk1$, $\Delta mpk1$ y $\Delta hog1$ como controles, ya que sabíamos que estos mutantes presentaban mayores niveles de fosforilación de las MAPKs en respuesta a cambios de pH.

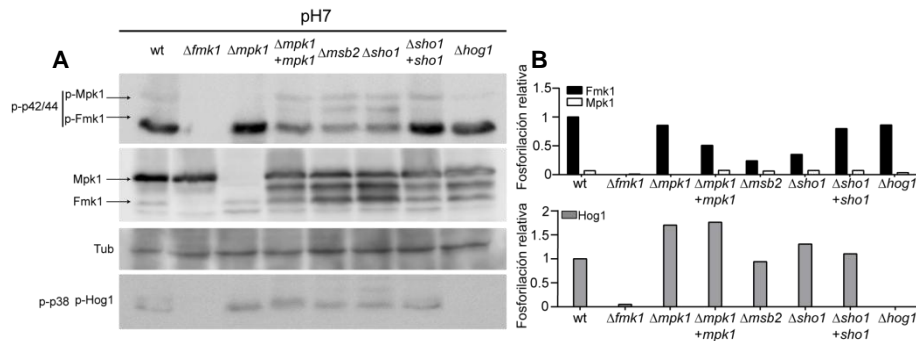


Figura 38. Msb2 y Sho1 contribuyen a la fosforilación de Fmk1 a pH ligeramente alcalino. A. Esporas de las cepas indicadas se germinaron durante 15 horas en PDB a pH7. Los western blot se realizaron y se cuantificaron B. como se describe en la Figura 22

También se comprobaron los niveles de fosforilación de las distintas MAPKs a los distintos pHs en los mutantes que carecen de las proteínas transmembrana Msb2 y Sho1. En la Figura 39 se muestra la fosforilación de las distintas MAPKs a pH 7. Mientras la fosforilación de Mpk1 y Hog1 no está afectada en los mutantes $\Delta msb2$ y $\Delta sho1$, mientras que el nivel de fosforilación de Fmk1 es menos de la mitad comparado con la cepa silvestre. Por lo tanto, como ya se había descrito anteriormente (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011, Perez-Nadales & Di Pietro, 2014), tanto Msb2 como Sho1 contribuyen a la activación de Fmk1 a pH 7.

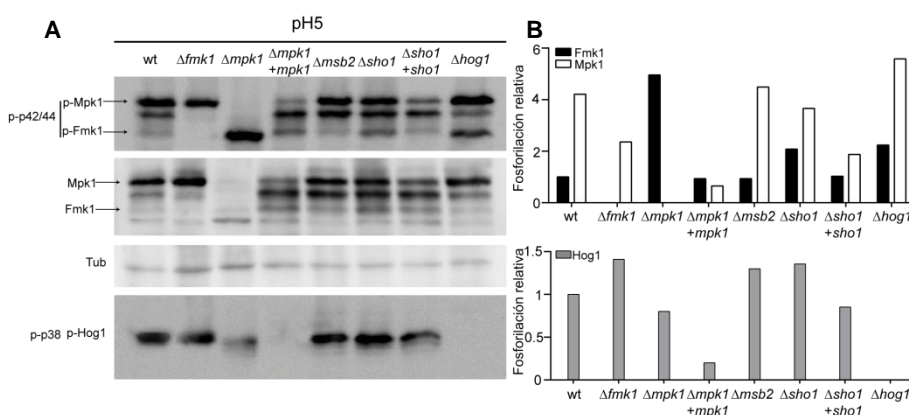


Figura 39. Sho1 contribuye a la desfosforilación de Fmk1. Esporas de las cepas indicadas se germinaron durante 15 horas en PDB a pH7, después se bajó el pH del medio a 5 y se incubó 30 minutos. Los western blot se realizaron A. y se cuantificaron B. como se describe en la Figura 22.

En la Figura 39 se muestra la fosforilación de las distintas MAPKs a pH 5. Cabe destacar aquí que el mutante $\Delta sho1$ presenta un mayor nivel de fosforilación de Fmk1 que la cepa silvestre (wt). El nivel es similar al del mutante $\Delta hog1$, aunque más bajo que en $\Delta mpk1$. También se aprecia que ni Msb2 ni Sho1 contribuyen a la fosforilación de Mpk1 y Hog1 en las condiciones del ensayo.

DISCUSIÓN

8. Discusión

La capacidad para modificar el pH del medio durante la infección, alcalinizándolo o acidificándolo, ha sido descrita en muchos hongos patógenos. Existen especies que acidifican el medio al infectar al huésped como *Penicillium spp* (Hadas *et al.*, 2007, Prusky *et al.*, 2004), *Botrytis spp* (Manteau *et al.*, 2003, ten Have *et al.*, 2001, Wubben *et al.*, 2000), *Sclerotinia spp* (Rollins & Dickman, 2001, Tae Kim *et al.*, 2007), *Phomopsis spp* (Davidzon *et al.*, 2009) y *Aspergillus spp* (Karaffa & Kubicek, 2003), y otras especies que alcalinizan el medio como *Colletotrichum spp* (Alkan *et al.*, 2008) o *Alternaria alternata* (Eshel *et al.*, 2002). Se ha descrito que la alcalinización o la acidificación están relacionadas, en la mayoría de los casos, con el metabolismo del nitrógeno.

En hongos no patógenos también se conoce la capacidad de alcalinizar o acidificar el medio. En levaduras se ha descrito que en función de la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento colonial, el hongo acidifica o alcaliniza el medio. Al utilizar como fuente de nitrógeno el amonio, acidifica el medio, mientras que al transportar el nitrato o secretar amoníaco, lo alcaliniza (Castrillo *et al.*, 1995, Palková *et al.*, 1997). La relación entre el metabolismo del nitrógeno y el cambio de pH del medio parece ser una respuesta conservada en hongos tanto patógenos como no patógenos y que regula procesos importantes tales como el crecimiento y la patogénesis.

8.1. El transporte de amonio conlleva una acidificación del medio

El transporte de amonio hacia el interior de la célula conlleva una acidificación del medio. En este trabajo hemos demostrado que el transporte de amonio en *F. oxysporum* se produce principalmente a través de la permeasa de amonio MepB, regulada a su vez por el factor de transcripción MeaB. En *Fusarium fujikuroi* la permeasa con mayor afinidad por el amonio se ha denominado MepB y es la principal encargada de transportar el amonio hacia el interior celular, ya que el mutante de esta permeasa presenta un menor crecimiento en medio con amonio como fuente de nitrógeno (Teichert *et al.*, 2008). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en este trabajo en *F. oxysporum*. En *S. cerevisiae* la permeasa de amonio que transporta amonio con mayor afinidad, denominada Mep2, está relacionada con el crecimiento pseudohifal (Lorenz & Heitman, 1998).

Los transportadores Mep2/MepB tienen tres histidinas, que están conservadas en toda la familia de permeasas de amonio Amt/Mep/Rh, que forman un poro hidrofóbico de 1.35 Å por el que se transporta el amonio. Se ha propuesto que antes de transportarse el amonio se desprotona y la molécula de amoníaco se alinea con las histidinas para pasar al interior celular, quedando el protón fuera, lo que lleva a la acidificación del medio. Una vez dentro de la célula, la molécula de amoníaco vuelve a protonarse y entra en el metabolismo del

nitrógeno (Khademi *et al.*, 2004). En este trabajo hemos demostrado que el transporte de amonio a través de MepB es esencial para que se produzca la acidificación del medio, quedando así demostrada la relación causal entre que el transporte de amonio y la acidificación del medio.

Por otra parte hemos observado que el mutante en el gen *mepB* no sólo está afectado en crecimiento sobre amonio, sino que tiene también un menor crecimiento en medios con nitrato como fuente de nitrógeno. En *Colletotrichum gloeosporoides* se ha descrito que los niveles de amonio intracelulares regulan la expresión de la glutamina sintetasa (Shnaiderman *et al.*, 2013), habiendo mayor expresión al aumentar los niveles de amonio intracelulares. Asumiendo que el mutante en el gen *mepB* tendría unos niveles intracelulares de amonio más bajos debido a su defecto en el transporte de amonio la expresión de la glutamina sintetasa sería más baja, y por lo tanto no podría utilizar de manera eficiente el amonio generado de la reducción del nitrato por la nitrato y nitrito reductasa. La regulación de la glutamina sintetasa por los niveles de amonio explicaría el menor crecimiento del mutante MepB en medios con nitrato o nitrito, sin embargo habría que realizar estudios de expresión de la glutamina sintetasa para confirmar esta hipótesis. Nuestros resultados con el inhibidor MSX demuestran que al inhibir la actividad de la glutamina sintetasa se detiene el transporte de amonio, indicando una posible regulación *feed-back* entre el amonio y la glutamina sintetasa.

8.2. El pH extracelular regula la virulencia de *F. oxysporum* reprogramando la fosforilación de las MAPKs

A lo largo de este estudio hemos demostrado como el crecimiento invasivo a través de membranas de celofán, la fusión vegetativa de hifas y la infección de la planta se regulan vía pH independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada, tal y como se había sugerido previamente (López-Berges *et al.*, 2010). Trabajos previos han demostrado que el pH y la virulencia tienen una estrecha correlación. Por ejemplo, el patógeno *Colletotrichum gloeosporoides* al realizar la invasión de fruto de aguacate alcaliza el tejido expulsando amonio (Miyara *et al.*, 2012). Esto indica que la conexión entre alcalinización del medio y la virulencia podría estar conservada en hongos patógenos. El hongo patógeno de humanos *Candida albicans* neutraliza la fuerte acidificación producida en el interior de los macrófagos mediante la expulsión de amonio, y dicha alcalinización, a su vez, induce el crecimiento el crecimiento filamentosos en el interior de macrófago (Kasper *et al.*, 2014, Vylkova & Lorenz, 2014).

Por otro lado, nuestros datos demuestran que la activación o represión de las funciones de virulencia se relaciona con una mayor o menor fosforilación de la MAPK Fmk1, que regula la ruta de la patogenicidad en *F. oxysporum*.

En *S. cerevisiae* se ha descrito recientemente que las dos MAPKs ortólogas Kss1 y Fus3, incrementan su nivel de fosforilación en respuesta a feromona cuando el pH intracelular sube de 6.2 a 6.6 (Isom *et al.*, 2013).

Observamos además que las dos MAPKs Mpk1 y Hog1 también responden a modificaciones en el pH extracelular, aunque con cambios de fosforilación opuestos a los de Fmk1. En *S. cerevisiae* los mutantes de la MAPK Slit2/Mpk1, de la MAPKK Mkk1-2, de la MAPKKK Bck1 así como de los receptores de esta ruta (Wsc1/2/3 y Mid2), tienen un menor crecimiento por debajo de pH 3, y un crecimiento normal a pH7 (Lucena *et al.*, 2012). Esto sugiere que la ruta de remodelación de la pared celular es necesaria para la respuesta a pH ácido. En el mismo trabajo se demuestra que la respuesta a pH ácido también se depende de la MAPK Hog1, pues el mutante en esta MAPK también muestra un crecimiento reducido de forma específica a pH inferior a 3 (Lucena *et al.*, 2012).

En resumen estos resultados sugieren que la fosforilación/desfosforilación de las distintas MAPKs en respuesta a cambios en el pH extracelular es una respuesta conservada en hongos.

8.3. La defosforilación de Fmk1 en respuesta a acidificación extracelular está regulada por la proteína transmembrana Sho1.

En el hongo modelo *S. cerevisiae*, el ortólogo de la MAPK Kss1 regula el crecimiento filamentoso y la invasión en agar en respuesta a falta de nutrientes (Truckses *et al.*, 2004, Qi & Elion, 2005). Dos proteínas transmembrana, Msb2 y Sho1, son necesarias para la activación del crecimiento filamentoso a través de Kss1 (Cullen *et al.*, 2004, Vadaie *et al.*, 2008). En condiciones de falta de nutrientes, Msb2 interactúa con Sho1 para activar la ruta del crecimiento filamentoso (Vadaie *et al.*, 2008). A su vez, Msb2 también participa en la ruta de Hog1 en respuesta a alta osmolaridad de glicerol (Tatebayashi *et al.*, 2007).

En *F. oxysporum* ya se había descrito que ambas proteínas mediaban la fosforilación de Fmk1 y la virulencia en plantas (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011, Perez-Nadales & Di Pietro, 2014). En el presente trabajo se corroboró que Msb2 y Sho1 contribuyen a la fosforilación de Fmk1. En *U. maydis* se ha relacionado Msb2 y Sho1 con la MAPK Kpp6, ortóloga a Kss1 y Fmk1, que regula la formación de apesorios. Sin embargo no se ha podido relacionar a estas proteínas con la ruta Hog1, ni con la ruta de estrés de pared que regula Slit2/Mpk1 (Lanver *et al.*, 2010).

En *C. albicans* se ha demostrado que los receptores Msb2 y Sho1 son necesarios para la fosforilación de la MAPK ortóloga Cek1 (Herrero de Dios *et al.*, 2013, Román *et al.*, 2005,

Román *et al.*, 2009), y para la fosforilación de Hog1 (Herrero-de-Dios *et al.*, 2014) sugiriendo estos resultados un punto de regulación para ambas rutas de señalización MAPK. Sin embargo en el presente estudio con *F. oxysporum* no se ha podido observar un efecto de Msb2 sobre la fosforilación de Hog1 en respuesta a cambios de pH. Esto sugiere que la participación de Msb2 en la activación de las distintas rutas MAPK difiere en distintas especies fúngicas.

8.4. Las tres rutas MAPK regulan distintos aspectos de la virulencia en *F. oxysporum*.

La MAPK Fmk1 es esencial para la patogenicidad de *F. oxysporum* (Di Pietro *et al.*, 2001). Fmk1 regula funciones de virulencia como la penetración de membranas de celofán, la adhesión a la raíz, la fusión vegetativa de hifas y la producción de enzimas pectinolíticas (Prados-Rosales *et al.*, 2012, López-Berges *et al.*, 2010, Rispaill & Di Pietro, 2009). En este estudio hemos observado que los diferentes dobles mutantes de Fmk1 y otra MAPK (Hog1 o Mpk1) tienen igualmente afectadas las funciones de virulencia. Así tanto el mutante $\Delta fmk1$ como los mutantes dobles $\Delta fmk1\Delta mpk1$ y $\Delta fmk1\Delta hog1$ no son capaces de penetrar membranas de celofán en ninguna condición, no secretan enzimas líticas, no aglutinan y no infectan las plantas de tomate. Estos datos corroboran la importancia de Fmk1 en la patogénesis en plantas. Estos En patógenos vegetales que forman apresorios tal como *M. oryzae*, *C. heterostrophus*, *C. orbiculare* y *P. teres* se ha relacionado la MAPK ortóloga a Fmk1 con la formación del apresorio, pues los mutantes de esta MPK no desarrolla apresorios funcionales y no pueden penetrar al interior del hospedador (Lev *et al.*, 1999, Ruiz-Roldán *et al.*, 2001, Takano *et al.*, 2000, Xu & Hamer, 1996). En hongos que no producen apresorio como *Botrytis cinera*, *Claviceps purpurea* o *F. graminearum* también se ha relacionado esta MAPK con la virulencia, ya que los mutantes no infectan al hospedador (Zheng *et al.*, 2000, Mey *et al.*, 2002b, Jenczmionka *et al.*, 2003). Por lo tanto, la importancia de esta ruta esta conservada en los hongos patógenos de plantas.

Sin embargo, Fmk1 es prescindible para la infección en modelos animales como ratones inmunodeprimidos y larvas de *G. mellonella* (Ortoneda *et al.*, 2004, Navarro-Velasco *et al.*, 2011). Al analizar la virulencia de los dobles mutantes en *G. mellonella*, se observa que si bien la delección de fmk1 solo no provoca ningún retraso en la infección, su eliminación en el fondo mutante en otra MAPK provoca una reducción de la virulencia mayor que en el mutante simple de la otra MAPK. Este resultado sugiere que Fmk1 contribuye de forma minoritaria a la infección de animales, aunque dicha contribución sólo es perceptible ante la delección de otro gen MAPK necesario para la infección de animales.

En este estudio hemos caracterizado por primera vez a los mutantes en las MAPKs Mpk1 y Hog1 en *F. oxysporum* habiendo realizado tanto los mutantes simples como todos dobles.

En *M. oryzae* o *F. graminearum* los mutantes en el ortólogo de *slt2/mpk1* tienen un crecimiento reducido tanto en medio líquido como en medio sólido, crecimiento que se restaura al crecer las cepas en medio con un estabilizador osmótico como el sobitol (Hou *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 1998). Por otra parte, Slt2/Mpk1 es necesario para varios procesos del desarrollo como la conidiación y la fusión vegetativa de hifas (Hou *et al.*, 2002). En hongos con apresorios, Slt2/Mpk1 es necesaria para la penetración del hospedador y la virulencia, a pesar de ser prescindible para el desarrollo de apresorios melanizados. (Kojima *et al.*, 2002, Mey *et al.*, 2002a, Rui & Hahn, 2007, Xu *et al.*, 1998). Al deletar el gen *mpk1* en *F. oxysporum*, obtuvimos fenotipos similares a los descritos en otros organismos. Esto demuestra que la ruta de la integridad de la pared celular de *F. oxysporum* está conservada y regulada por la MAPK Mpk1. El mutante $\Delta mpk1$ muestra una virulencia muy atenuada en plantas de tomate, siendo ésta todavía más retrasada en el mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$. La reducción en virulencia podría ser debida a que los mutantes son reconocidos por el sistema de defensa de la planta, posiblemente por encontrarse su pared alterada.

Sin embargo el mutante $\Delta mpk1$ no presenta ningún defecto en la penetración de celofán. Incluso penetra a pH 5, donde no se observa penetración en la cepa silvestre. Es probable que la mayor penetración a pH 5 se deba a que en este mutante no se produce la desfosforilación de Fmk1 a pH bajo como en el silvestre. Por otro lado, el mutante doble $\Delta mpk1\Delta hog1$ no penetra a pH 5 a pesar de mostrar incluso un mayor nivel de fosforilación de Fmk1 que $\Delta mpk1$ (ver discusión en el siguiente apartado). Finalmente el mutante $\Delta mpk1$ también muestra un retraso en la infección de *G. mellonella*, lo que demuestra la importancia de Mpk1 en la virulencia. Es retraso es mucho mayor en el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$, lo que indica que ambas MAPKs contribuyen a la virulencia, posiblemente, de forma sinérgica.

Por último, Hog1 está descrita en muchos organismos como la MAPK que determina la respuesta en estrés hiperosmótico y en algunos organismos regula la virulencia (Dixon *et al.*, 1999, Igaría *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2004b, Segmüller *et al.*, 2007, Van Nguyen *et al.*, 2012). Hog1 se fosforila rápidamente ante estrés hiperosmótico y ante la presencia de fungicidas de tipo fenilpirrol o dicarboxamida, siendo los mutantes en esta ruta resistentes a dichos fungicidas (Lin & Chung, 2010). En el presente estudio se demuestra que los distintos mutantes en Hog1 de *F. oxysporum* tienen un menor crecimiento ante concentraciones altas de sales u osmolitos y muestran resistencia a los fungicidas iprodión y fludioxonil. Los mutantes $\Delta hog1$ tienen un retraso significativo en la infección tanto de plantas como en *G. mellonella*, siendo este retraso mucho más acusado en el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ como se comentó anteriormente. En otros patógenos de plantas los mutantes en Hog1 pueden

tener afectada la virulencia o no. Así, por ejemplo, en *M. oryzae* los mutantes en *hog1* no tienen afectada la virulencia y el hongo es capaz de desarrollar y acumular glicerol con el que generar turgencia en el interior del apresorio (Dixon *et al.*, 1999). Sin embargo en *C. heterosporum*, los mutantes en esta MAPK producen apresorios más pequeños y el hospedador presenta unos síntomas de infección más atenuados (Igbaria *et al.*, 2008). En *F. graminearum*, Hog1 es necesario para el crecimiento invasivo en plantas de maíz o trigo (Van Nguyen *et al.*, 2012), y en *B. cinérea* se ha descrito que la fosforilación y traslocación de Hog1 al núcleo es necesaria en los estadios tempranos de la infección (Doehlemann *et al.*, 2006) y para la penetración del hospedador (Segmüller *et al.*, 2007). Estos resultados apoyan los datos obtenidos en este trabajo en *F. oxysporum*.

Basandonos en los resultados mencionados, proponemos un nuevo modelo de trabajo en el que resumimos el efecto del transporte de las distintas fuentes de nitrógeno sobre el pH extracelular y el papel regulador del pH sobre la fosforilación/desfosforilación de las tres MAPKs de *F. oxysporum* (Figura 41).

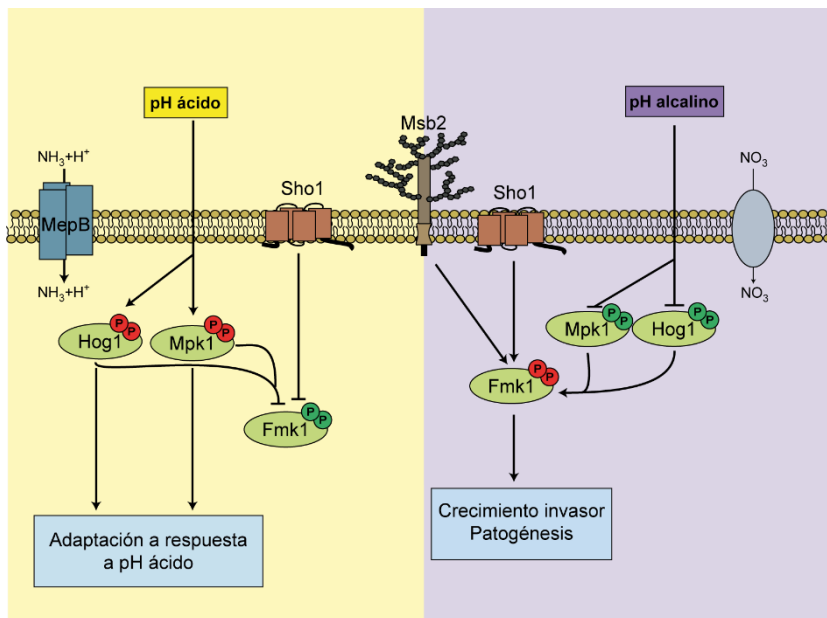


Figura 41. Modelo de regulación por pH de las MAPKs en *F. oxysporum*.

8.5. Las distintas MAPKs cooperan la respuesta a cambios del pH extracelular

En numerosos sistemas biológicos, las rutas MAPK cooperan entre ellas (y con otras rutas) para regular el crecimiento celular (Levin, 2005). En *S. cerevisiae* se han estudiado las interacciones entre las distintas MAPKs. Mpk1 se activa principalmente en respuesta a estrés

de pared para regular el crecimiento vegetativo, pero también responde ante otros estímulos como las feromonas, promoviendo una fusión celular más efectiva, y choque térmico (García-Rodríguez *et al.*, 2005, Kollár *et al.*, 1997, Levin, 2005, Buehrer & Errede, 1997, Zanzov *et al.*, 1996). Esto sugiere una conexión entre la ruta de respuesta a feromona y la ruta de integridad de la pared celular. En determinadas situaciones del crecimiento filamentosos, las MAPKs Kss1 y Mpk1/Slit2 pueden activarse paralelamente, como sucede en respuesta a defectos en la glicosilación de las proteínas (Cullen *et al.*, 2000). Los componentes de la ruta de la integridad como los receptores Wsc1/2 y Mid2 o la MAPK Mpk1/Slit2 contribuyen al crecimiento filamentosos ya que modulan la elongación celular, la unión célula-célula y la invasión en agar, respuesta que además requiere proteínas como Msb2, Ste20 y Ste12 y, en menor medida, a Sho1 (Birkaya *et al.*, 2009).

En nuestro estudio apreciamos que Mpk1 y Fmk1 responden de manera opuesta a cambios de pH. Cuando *F. oxysporum* infecta la planta, desarrolla unas hifas de penetración especializadas (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011). Es probable que se requieran cambios en la pared de dichas hifas para que puedan crecer en el interior de la planta sin ser detectadas por el sistema inmune, y que para ello sea necesario que Mpk1 este inactiva. El mutante $\Delta mpk1$ presenta unos niveles de fosforilación de Fmk1 más elevados que la cepa silvestre, lo que sugiere que Mpk1 actúa como regulador negativo de Fmk1 (Figura 41). Asimismo, Fmk1 inhibe la fosforilación tanto de Mpk1 como de Hog1, ya que los mutantes dobles $\Delta fmk1\Delta mpk1$ y $\Delta fmk1\Delta hog1$ presentan una mayor fosforilación de Hog1 y Mpk1, respectivamente. Esto indica que cuando se produce la activación de la ruta de la patogenicidad (Fmk1), debe llevarse a cabo una regulación paralela de las otras dos vías MAPKs para adaptar el crecimiento, o bien para promover cambios en la pared o en diferentes estructuras celulares, para lo que es necesaria la inactivación de Mpk1 y Hog1.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que los daños en la pared celular (Bermejo *et al.*, 2008, García-Rodríguez *et al.*, 2005, García *et al.*, 2009, Hawle *et al.*, 2007) o el estrés hiperosmótico (Bermejo *et al.*, 2008, García-Rodríguez *et al.*, 2005) provocan la activación simultánea de las cascadas Hog1 y Slit2/Mpk1. El tratamiento con zimolasa, una enzima que degrada la pared celular, activa tanto Mpk1/Slit2 como Hog1, siendo la activación de Hog1 mediada por el receptor transmembrana Sho1 (Bermejo *et al.*, 2008). Por otra parte se ha descrito que el mutante nulo *hog1* tiene reprimidos los genes involucrados en la remodelación de la pared celular, regulados habitualmente por la MAPK Slit2/Mpk1 (*fsk1*, *chs1*, *gas1*, *kre6*, *pkh1*, *mnn9*, *rlm1*, *msn2/4*, *crz1*, *cin5* y *hsp150*) durante el crecimiento a pH inferior a 3, sugiriendo una cooperación entre ambas rutas MAPK (Lucena *et al.*, 2012). Otros estudios en *S. cerevisiae* han demostrado que tanto Slit2/Mpk1 como Hog1 se fosforilan en respuesta al ácido acético, siendo los componentes de la ruta Hog1, pero no las de la ruta Mpk1, necesarios para el crecimiento en presencia de altas concentraciones del ácido

(Mollapour & Piper, 2006). Los resultados del presente trabajo indican que en *F. oxysporum* Mpk1 y Hog1 cooperan para mediar una respuesta a la acidificación del medio extracelular. Al analizar el patrón de fosforilación de Mpk1 y Hog1, observamos que ambas MAPKs se fosforilan y desfosforilan de manera paralela, lo que sugiere que ambas regulen procesos importantes para la adaptación a pH ácido. Estos procesos podrían estar relacionados con cambios en la pared e, incluso, con cambios en el ciclo celular. Para confirmar estas hipótesis será necesario un análisis comparativo de expresión de genes relacionados con dichos procesos entre el silvestre y los mutantes crecidos a pH ácido.

Por otra parte, a pH alcalino tanto Mpk1 como Hog1 se desfosforilan. Esto puede estar relacionado con un cambio en el crecimiento o el desarrollo de estructuras de infección que impliquen una remodelación de la pared celular para desarrollar las hifas de penetración. Cabe destacar que tanto el doble mutante $\Delta mpk1\Delta hog1$ presenta unos niveles de fosforilación de Fmk1 mucho mayores que los mutantes simples en dichos genes, lo que nos sugiere una posible cooperación entre Mpk1 y Hog1 en la respuesta a los cambios de pH extracelulares.

Al someter a estrés osmótico a células de levadura, no sólo se activa la ruta HOG, sino que además se activan también Kss1 y Fus3, aunque en este caso dicha activación no promueve el crecimiento invasivo (Shock *et al.*, 2009, Vidal *et al.*, 2013). También se ha demostrado que existe una retroalimentación entre Hog1 y la proteína de anclaje Ste50, pudiendo ser esta proteína el punto de enlace entre las cascadas de señalización Kss1 y Hog1 (Hao *et al.*, 2008). Ste50 está conservada en la mayoría de los hongos patógenos, incluyendo *F. oxysporum*, aunque su papel no ha sido estudiado en detalle (Rispaill *et al.* 2009). Otros trabajos en *S. cerevisiae* proponen que la activación de Hog1 por estrés osmótico supone una inhibición indirecta de los reguladores del factor de transcripción Ste12, Tec1 y Dig1 (Shock *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que en respuesta a estrés osmótico, tanto Fus3 como Kss1 colocalizan en sitios específicos del núcleo con el factor de transcripción Ste12 (Vidal *et al.*, 2013), lo que confirmaría la importancia de Hog1 en la regulación de Ste12. Estos resultados nos ayudarían a explicar porque el mutante $\Delta hog1$ no penetraría el celofán en determinadas condiciones (presencia de casaminoácidos). Es posible que la presencia de los aminoácidos podría suponer un estrés osmótico suficiente para activar ambas cascadas de señalización, pero no para inhibir el crecimiento del mutante $\Delta hog1$. Por otra parte, el mecanismo de retroalimentación de Ste50 podría explicar la mayor fosforilación de Fmk1 en el mutante $\Delta hog1$, ya que en ausencia de Hog1, Ste50 estaría hiperestimulando la cascada de Fmk1.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. *F. oxysporum* internaliza el amonio principalmente a través de la permeasa MepB.
2. El transporte de amonio hacia el interior celular conlleva una acidificación del medio, mientras que el transporte de nitrato conlleva una alcalinización.
3. El pH, y no la fuente de nitrógeno, regula las funciones de virulencia y la patogénesis de *F. oxysporum*.
4. Durante la infección de la raíz de tomate, *F. oxysporum* induce una alcalinización del medio, contrarrestando la acidificación producida normalmente por la raíz.
5. Los cambios en el pH extracelular afectan al estado de fosforilación de las tres MAPKs Fmk1, Mpk1 y Hog1. Fmk1 se fosforila a pH 7 y se desfosforila a pH 5, mientras que Mpk1 y Hog1 tienen un patrón opuesto.
6. Msb2 y Sho1 contribuyen a la fosforilación de Fmk1 a pH 7, y Sho1, además, a su defosforilación a pH 5.
7. Mpk1 y Hog1 son necesarias para la desfosforilación de Fmk1 a pH 5.
8. La delección simultánea de dos MAPKs conlleva una mayor fosforilación de la MAPK restante.
9. Las tres MAPKs tienen funciones importantes y complementarias en la virulencia de *F. oxysporum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N., (1997) Plant Pathology, San Diego. In.: CA Academic Press, pp.
- Alexander, M. R., M. Tyers, M. Perret, B. M. Craig, K. S. Fang & M. C. Gustin, (2001) Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Molecular biology of the cell* **12**: 53-62.
- Alkan, N., R. Fluhr, A. Sherman & D. Prusky, (2008) Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 1058-1066.
- Alonso-Monge, R., F. Navarro-García, G. Molero, R. Diez-Orejas, M. Gustin, J. Pla, M. Sanchez & C. Nombela, (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **181**: 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., F. Navarro-García, E. Román, A. I. Negro, B. Eisman, C. s. Nombela & J. Pla, (2003) The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **2**: 351-361.
- Arana, D. M., C. Nombela, R. Alonso-Monge & J. Pla, (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 1033-1049.
- Armstrong, G. M. & J. K. Armstrong, (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. 391-399.
- Austin, B., R. M. Hall & B. M. Tyler, (1990) Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* **93**: 157-162.
- Baayen, R. P., K. O'Donnell, P. J. Bonants, E. Cigelnik, L. P. Kroon, E. n. J. Roebroek & C. Waalwijk, (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90**: 891-900.
- Baetz, K., J. Moffat, J. Haynes, M. Chang & B. Andrews, (2001) Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Sit2 and the cell cycle regulator Swi4. *Molecular and cellular biology* **21**: 6515-6528.
- Beckman, C. H., (1987) *The nature of wilt diseases of plants*. APS press.
- Beever, R. E. & E. G. Bollard, (1970) The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *Journal of General Microbiology* **60**: 273-279.
- Bennett, R. J. & A. D. Johnson, (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 233-255.
- Bermejo, C., E. Rodríguez, R. García, J. M. Rodríguez-Peña, M. L. R. de la Concepción, C. Rivas, P. Arias, C. Nombela, F. Posas & J. Arroyo, (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular biology of the cell* **19**: 1113-1124.
- Birkaya, B., A. Maddi, J. Joshi, S. J. Free & P. J. Cullen, (2009) Role of the cell wall integrity and filamentous growth mitogen-activated protein kinase pathways in cell wall remodeling during filamentous growth. *Eukaryotic cell* **8**: 1118-1133.
- Biswas, K. & J. Morschhäuser, (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **56**: 649-669.
- Bluhm, B. H., X. Zhao, J. E. Flaherty, J. R. Xu & L. D. Dunkle, (2007) RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 627-636.
- Bölker, M., (1998) Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **25**: 143-156.
- Booth, C., (1971) *The genus Fusarium*.
- Borneman, A. R., T. A. Gianoulis, Z. D. Zhang, H. Yu, J. Rozowsky, M. R. Seringhaus, L. Y. Wang, M. Gerstein & M. Snyder, (2007) Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**: 815-819.
- Bouarab, K., R. Melton, J. Peart, D. Baulcombe & A. Osbourn, (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889-892.

- Brachmann, A., J. Schirawski, P. Müller & R. Kahmann, (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **22**: 2199-2210.
- Bravo-Ruiz, G., C. Ruiz-Roldán & M. I. G. Roncero, (2013) Lipolytic System of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 1054-1067.
- Buehrer, B. M. & B. Errede, (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **17**: 6517-6525.
- Burgwyn-Fuchs, B. & E. Mylonakis, (2006) Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current opinion in microbiology* **9**: 346-351.
- Burnett, J. H., (1984) Aspects of *Fusarium* genetics. *The applied mycology of Fusarium*: 39-69.
- Bussink, H.-J. & S. A. Osmani, (1999) A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *FEMS microbiology letters* **173**: 117-125.
- Butty, A.-C., P. M. Pryciak, L. S. Huang, I. Herskowitz & M. Peter, (1998) The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* **282**: 1511-1516.
- Caddick, M. X., (2004) Nitrogen Regulation in Mycelial Fungi. In: *Biochemistry and Molecular Biology*. R. M. Brambl, G. A. (ed). Berlin, pp. 349-368.
- Calera, J. A., X.-J. Zhao & R. Calderone, (2000) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infection and immunity* **68**: 518-525.
- Callow, J. A., (1987) Models for host-pathogen interaction. *Genetics and Plant Pathogenesis*: 283-295.
- Cañero, D. C. & M. I. G. Roncero, (2008) Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* **154**: 1474-1481.
- Caracuel, Z., A. L. Martínez-Rocha, A. Di Pietro, M. P. Madrid & M. I. G. Roncero, (2005) *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative beta-1, 3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions* **18**: 1140-1147.
- Caracuel, Z., M. I. G. Roncero, E. A. Espeso, C. I. González-Verdejo, F. I. García-Maceira & A. Di Pietro, (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular microbiology* **48**: 765-779.
- Carroll, A. M., J. A. Sweigard & B. Valent, (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet. Newsl* **41**: 1992.
- Castrillo, J. I., I. De Miguel & U. O. Ugalde, (1995) Proton production and consumption pathways in yeast metabolism. A chemostat culture analysis. *Yeast* **11**: 1353-1365.
- Catlett, N. L., B. N. Lee, O. C. Yoder & B. G. Turgeon, (2003) Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter*: 9-11.
- Clotet, J., X. Escote, M. À. Adrover, G. Yaakov, E. Garí, M. Aldea, E. de Nadal & F. Posas, (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *The EMBO journal* **25**: 2338-2346.
- Corral-Ramos, C., M. Roca, A. Di Pietro, M. González-Roncero & C. Ruiz-Roldán, (2014) Autophagy contributes to regulation of nuclear dynamics during vegetative growth and hyphal fusion in *Fusarium oxysporum*. *Autophagy*.
- Correia, I., R. Alonso-Monge & J. Pla, (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future microbiology* **5**: 1125-1141.
- Crespo, J. & M. N. Hall, (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 579-591.
- Crespo, J., T. Powers, B. Fowler & M. N. Hall, (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 6784-6789.

- Csank, C., K. Schräppel, E. Leberer, D. Harcus, O. Mohamed, S. Meloche, D. Y. Thomas & M. Whiteway, (1998) Roles of the *Candida albicans* Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, Cek1p, in Hyphal Development and Systemic Candidiasis. *Infection and immunity* **66**: 2713-2721.
- Cullen, P. J., W. Sabbagh, E. Graham, M. M. Irick, E. K. van Olden, C. Neal, J. Delrow, L. Bardwell & G. F. Sprague, (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & development* **18**: 1695-1708.
- Cullen, P. J., J. Schultz, J. Horecka, B. J. Stevenson, Y. Jigami & G. F. Sprague, (2000) Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- Czymmek, K. J., M. Fogg, D. H. Powell, J. Sweigard, S.-Y. Park & S. Kang, (2007) *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1011-1023.
- Chauhan, N., D. Inglis, E. Roman, J. Pla, D. Li, J. A. Calera & R. Calderone, (2003) *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryotic cell* **2**: 1018-1024.
- Cheetham, J., D. A. Smith, A. da Silva Dantas, K. S. Doris, M. J. Patterson, C. R. Bruce & J. Quinn, (2007) A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **18**: 4603-4614.
- Chen, J., J. Chen, S. Lane & H. Liu, (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **46**: 1335-1344.
- Chen, R. E. & J. Thorner, (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1773**: 1311-1340.
- Chol, K.-Y., B. Satterberg, D. M. Lyons & E. A. Elion, (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499-512.
- Daboussi, M.-J. e. & P. Capy, (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Reviews in Microbiology* **57**: 275-299.
- Davidzon, M., I. Kobiler, N. Alkan & D. Prusky, (2009) Acidification of fruit environment by gluconic acid during decay development of *Phomopsis mangiferae*. *Postharvest Biol. Technol* **55**: 71-77.
- de Groot, M. J., P. Bundock, P. J. Hooykaas & A. G. Beijersbergen, (1998) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**: 839-842.
- de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené & M. J. Figueras, (2000) *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- de Nadal, E., P. M. Alepuz & F. Posas, (2002) Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO reports* **3**: 735-740.
- De Virgilio, C. & R. Loewith, (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**: 6392-6415.
- Delgado-Jarana, J., A. L. Martínez-Rocha, R. Roldán-Rodríguez, M. I. g. Roncero & A. Di Pietro, (2005) *Fusarium oxysporum* G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 61-72.
- Desjardins, A. E., T. M. Hohn & S. P. McCORMICK, (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological reviews* **57**: 595-604.
- Di Pietro, A., F. I. Garcia-Maceira, M. D. Huertas-Gonzalez, M. C. Ruiz-Roldan, Z. Caracuel, A. S. Barbieri & M. I. G. Roncero, (1998) Endopolygalacturonase PG1 in Different Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*. *Applied and environmental microbiology* **64**: 1967-1971.

- Di Pietro, A., F. I. Garcia-Maceira, E. Meglecic & M. I. Roncero, (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology* **39**: 1140-1152.
- Di Pietro, A. & M. I. Roncero, (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.
- Di Pietro, A., M. I. G. Roncero & M. d. C. R. Roldán, (2009) From tools of survival to weapons of destruction: The role of cell wall-degrading enzymes in plant infection. In: *Plant Relationships*. Springer, pp. 181-200.
- Diez-Orejas, R., G. Molero, F. Navarro-García, J. Pla, C. Nombela & M. Sanchez-Perez, (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infection and immunity* **65**: 833-837.
- Divon, H. H., C. Ziv, O. Davydov, O. Yarden & R. Fluhr, (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular plant pathology* **7**: 485-497.
- Dixon, K. P., J.-R. Xu, N. Smirnov & N. J. Talbot, (1999) Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **11**: 2045-2058.
- Doehlemann, G., P. Berndt & M. Hahn, (2006) Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular microbiology* **59**: 821-835.
- Du, C., J. Sarfati, J. P. Latge & R. Calderone, (2006) The role of the sakA (Hog1) and tcsB (sln1) genes in the oxidant adaptation of *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology* **44**: 211-218.
- Duyvesteijn, R. G. E., R. Van Wijk, Y. Boer, M. Rep, B. J. C. Cornelissen & M. A. Haring, (2005) Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Molecular microbiology* **57**: 1051-1063.
- Eisman, B., R. Alonso-Monge, E. Roman, D. Arana, C. Nombela & J. Pla, (2006) The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **5**: 347-358.
- Elion, E. A., (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Current opinion in microbiology* **3**: 573-581.
- Enjalbert, B., D. A. Smith, M. J. Cornell, I. Alam, S. Nicholls, A. J. P. Brown & J. Quinn, (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **17**: 1018-1032.
- Escoté, X., M. Zapater, J. Clotet & F. Posas, (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biology* **6**: 997-1002.
- Eshel, D., I. Miyara, T. Ailing, A. Dinooor & D. Prusky, (2002) pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 774-779.
- Farman, M. L., Y. Eto, T. Nakao, Y. Tosa, H. Nakayashiki, S. Mayama & S. A. Leong, (2002) Analysis of the structure of the AVR1-CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 6-16.
- Flor, H. H., (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: 653-669.
- Flor, H. H., (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* **9**: 275-296.
- Gagiano, M., F. F. Bauer & I. S. Pretorius, (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **2**: 433-470.
- Gancedo, J. M., (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **25**: 107-123.
- García-Rodríguez, L. J., R. Valle, Á. Durán & C. Roncero, (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS letters* **579**: 6186-6190.

- García, R., C. Bermejo, C. Grau, R. Pérez, J. M. Rodríguez-Peña, J. Francois, C. Nombela & J. Arroyo, (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 15183-15195.
- García, R., J. M. Rodríguez-Peña, C. Bermejo, C. Nombela & J. Arroyo, (2009) The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 10901-10911.
- Gartner, A., A. Jovanovic, D.-I. Jeoung, S. Bourlat, F. R. Cross & G. Ammerer, (1998) Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, *in vivo*. *Molecular and cellular biology* **18**: 3681-3691.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles & G. R. Fink, (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander & K. Davenport, (1998) MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews* **62**: 1264-1300.
- Hadas, Y., I. Goldberg, O. Pines & D. Prusky, (2007) Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. *Phytopathology* **97**: 384-390.
- Hamel, L.-P., M.-C. Nicole, S. Duplessis & B. E. Ellis, (2012) Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell Online* **24**: 1327-1351.
- Hao, N., Y. Zeng, T. C. Elston & H. G. Dohlman, (2008) Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 33798-33802.
- Hardie, D. G., D. Carling & M. Carlson, (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual review of biochemistry* **67**: 821-855.
- Hawle, P., D. Horst, J. P. Bebelman, X. X. Yang, M. Siderius & S. M. van der Vies, (2007) Cdc37p is required for stress-induced high-osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Stt2p (Mpk1p). *Eukaryotic cell* **6**: 521-532.
- Herrero-de-Dios, C., R. Alonso-Monge & J. Pla, (2014) The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* **69**: 31-42.
- Herrero de Dios, C., E. Román, C. Diez, R. Alonso-Monge & J. Pla, (2013) The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* **50**: 21-32.
- Hohmann, S., M. Krantz & B. Nordlander, (2007) Yeast osmoregulation. *Methods in enzymology* **428**: 29-45.
- Hou, Z., C. Xue, Y. Peng, T. Katan, H. C. Kistler & J.-R. Xu, (2002) A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 1119-1127.
- Houterman, P. M., B. J. C. Cornelissen & M. Rep, (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* **4**: e1000061.
- Huertas-Gonzalez, M. D., M. C. Ruiz-Roldan, A. Di Pietro & M. I. G. Roncero, (1999) Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiological and molecular plant pathology* **54**: 63-72.
- Igbaria, A., S. Lev, M. S. Rose, B. N. Lee, R. Hadar, O. Degani & B. A. Horwitz, (2008) Distinct and combined roles of the MAP kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in virulence and stress responses. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 769-780.
- Imazaki, I., M. Kurahashi, Y. Iida & T. Tsuge, (2007a) Fow2, a Zn (II) 2Cys6-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular microbiology* **63**: 737-753.

- Imazaki, I., M. Kurahashi, Y. Iida & T. Tsuge, (2007b) Fow2, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* **63**: 737-753.
- Inoue, I., F. Namiki & T. Tsuge, (2002) Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires *fow1*, a gene encoding a mitochondrial protein. *The Plant Cell Online* **14**: 1869-1883.
- Isom, D. G., V. Sridharan, R. Baker, S. T. Clement, D. M. Smalley & H. G. Dohlman, (2013) Protons as second messenger regulators of G protein signaling. *Molecular cell* **51**: 531-538.
- Jain, S., K. Akiyama, K. Mae, T. Ohguchi & R. Takata, (2002) Targeted disruption of a G protein alpha-subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current genetics* **41**: 407-413.
- Jain, S., K. Akiyama, R. Takata & T. Ohguchi, (2005) Signaling via the G protein beta-subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS microbiology letters* **243**: 165-172.
- Jenczmionka, N. J., F. J. Maier, A. P. Löscher & W. Schäfer, (2003) Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase *gpmk1*. *Current genetics* **43**: 87-95.
- Jones, J. D. G. & J. L. Dangl, (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jung, U. S., A. K. Sobering, M. J. Romeo & D. E. Levin, (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular microbiology* **46**: 781-789.
- Karaffa, L. & C. P. Kubicek, (2003) *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied microbiology and biotechnology* **61**: 189-196.
- Kasper, L., K. Seider, F. Gerwien, S. Allert, S. Brunke, T. Schwarzmüller, L. Ames, C. Zubiria-Barrera, M. K. Mansour & U. Becken, (2014) Identification of *Candida glabrata* Genes Involved in pH Modulation and Modification of the Phagosomal Environment in Macrophages. *PLoS one* **9**: e96015.
- Khademi, S., J. O'Connell, J. Remis, Y. Robles-Colmenares, L. J. W. Miercke & R. M. Stroud, (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**: 1587-1594.
- Klein, S., H. Reuveni & A. Levitzki, (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 3219-3223.
- Knogge, W., (1996) Fungal infection of plants. *The Plant cell* **8**: 1711.
- Köhler, J. R. & G. R. Fink, (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 13223-13228.
- Kojima, K., T. Kikuchi, Y. Takano, E. Oshiro & T. Okuno, (2002) The mitogen-activated protein kinase gene MAF1 is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 1268-1276.
- Kollár, R., B. B. Reinhold, E. Petráková, H. J. C. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonová, J. C. Kapteyn, F. M. Klis & E. Cabib, (1997) Architecture of the Yeast Cell Wall $\beta(1-6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1-3)$ -glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 17762-17775.
- Kron, S. J., C. A. Styles & G. R. Fink, (1994) Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **5**: 1003-1022.
- Kumamoto, C. A., (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 5576-5581.
- Kurjan, J., (1993) The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* **27**: 147-179.
- Kushner, S. R., (1978) An improved method for transformation of *Escherichia coli*.

- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**: 680-685.
- Lanver, D., A. Mendoza-Mendoza, A. Brachmann & R. Kahmann, (2010) Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *The Plant cell* **22**: 2085-2101.
- Leberer, E., D. H Marcus, I. D. Broadbent, K. L. Clark, D. Dignard, K. Ziegelbauer, A. Schmidt, N. A. R. Gow, A. J. P. Brown & D. Y. Thomas, (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 13217-13222.
- Leberer, E., D. H Marcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D. Y. Thomas & K. Schröppel, (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **42**: 673-687.
- Lee, Y.-H. & R. A. Dean, (1993) cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **5**: 693-700.
- Lesage, G. & H. Bussey, (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 317-343.
- Lev, S. & B. A. Horwitz, (2003) A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. *The Plant Cell Online* **15**: 835-844.
- Lev, S., A. Sharon, R. Hadar, H. Ma & B. A. Horwitz, (1999) A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13542-13547.
- Levin, D. E., (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* **69**: 262-291.
- Li Destri Nicosia, M. G., C. Brocard-Masson, S. Demais, A. Hua Van, M. J. Daboussi & C. Scazzocchio, (2001) Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **39**: 1330-1344.
- Li, L., C. Xue, K. Bruno, M. Nishimura & J.-R. Xu, (2004) Two PAK kinase genes, CHM1 and MST20, have distinct functions in *Magnaporthe grisea*. *Molecular plant-microbe interactions* **17**: 547-556.
- Lin, C.-H. & K.-R. Chung, (2010) Specialized and shared functions of the histidine kinase-and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 818-827.
- López-Berges, M. S., J. Capilla, D. Turrà, L. Schafferer, S. Matthijs, C. Jochl, P. Cornelis, J. Guarro, H. Haas & A. Di Pietro, (2012) HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell Online* **24**: 3805-3822.
- Lopez-Berges, M. S., A. Di Pietro, M. J. Daboussi, H. A. Wahab, C. Vasnier, M. I. Roncero, M. Dufresne & C. Hera, (2009) Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici by large-scale transposon tagging. *Mol Plant Pathol* **10**: 95-107.
- López-Berges, M. S., C. Hera, M. Sulyok, K. Schäfer, J. Capilla, J. Guarro & A. Di Pietro, (2013) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular microbiology* **87**: 49-65.
- Lopez-Berges, M. S., N. Rispail, R. C. Prados-Rosales & A. Di Pietro, (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence in plant pathogenic fungi: role of TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant signaling & behavior* **5**: 1623-1625.
- López-Berges, M. S., N. Rispail, R. C. Prados-Rosales & A. Di Pietro, (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell Online* **22**: 2459-2475.
- López-Fernández, L., C. Ruiz-Roldán, Y. Pareja-Jaime, A. Prieto, H. Khraiwesh & M. I. G. Roncero, (2013) The *Fusarium oxysporum* gnt2, Encoding a Putative N-

- Acetylglucosamine Transferase, Is Involved in Cell Wall Architecture and Virulence. *PloS one* **8**: e84690.
- Lorenz, M. C. & J. Heitman, (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **17**: 1236-1247.
- Lucena, R. M., C. Elsztein, D. A. Simoes & M. A. Morais, (2012) Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. *Journal of applied microbiology* **113**: 629-640.
- Ma, D., J. G. Cook & J. Thorner, (1995) Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Molecular biology of the cell* **6**: 889-909.
- Ma, L. J., H. C. van der Does, K. A. Borkovich, J. J. Coleman, M. J. Daboussi, A. Di Pietro, M. Dufresne, M. Freitag, M. Grabherr, B. Henrissat, P. M. Houterman, S. Kang, W. B. Shim, C. Woloshuk, X. Xie, J. R. Xu, J. Antoniw, S. E. Baker, B. H. Bluhm, A. Breakspear, D. W. Brown, R. A. Butchko, S. Chapman, R. Coulson, P. M. Coutinho, E. G. Danchin, A. Diener, L. R. Gale, D. M. Gardiner, S. Goff, K. E. Hammond-Kosack, K. Hilburn, A. Hua-Van, W. Jonkers, K. Kazan, C. D. Kodira, M. Koehrsen, L. Kumar, Y. H. Lee, L. Li, J. M. Manners, D. Miranda-Saavedra, M. Mukherjee, G. Park, J. Park, S. Y. Park, R. H. Proctor, A. Regev, M. C. Ruiz-Roldan, D. Sain, S. Sakthikumar, S. Sykes, D. C. Schwartz, B. G. Turgeon, I. Wapinski, O. Yoder, S. Young, Q. Zeng, S. Zhou, J. Galagan, C. A. Cuomo, H. C. Kistler & M. Rep, (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367-373.
- Ma, Y., J. Qiao, W. Liu, Z. Wan, X. Wang, R. Calderone & R. Li, (2008) The *sho1* sensor regulates growth, morphology, and oxidant adaptation in *Aspergillus fumigatus* but is not essential for development of invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity* **76**: 1695-1701.
- Madden, K., Y.-J. Sheu, K. Baetz, B. Andrews & M. Snyder, (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**: 1781-1784.
- Madhani, H. D. & G. R. Fink, (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317.
- Madrid, M. P., A. Di Pietro & M. I. G. Roncero, (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular microbiology* **47**: 257-266.
- Malardier, L., M. J. Daboussi, J. Julien, F. Roussel, C. Scazzocchio & Y. Brygoo, (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**: 147-156.
- Manteau, S., S. Abouna, B. Lambert & L. Legendre, (2003) Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS microbiology ecology* **43**: 359-366.
- Marcus, S., A. Polverino, M. Barr & M. Wigler, (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 7762-7766.
- Margelis, S., C. D'Souza, A. J. Small, M. J. Hynes, T. H. Adams & M. A. Davis, (2001) Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology* **183**: 5826-5833.
- Marini, A.-M., S. Soussi-Boudekou, S. Vissers & B. Andre, (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **17**: 4282-4293.
- Martín-Urdiroz, M., M. I. G. Roncero, J. A. González-Reyes & C. Ruiz-Roldán, (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 112-121.
- Martínez-Rocha, A. L., M. I. G. Roncero, A. López-Ramírez, M. Mariné, J. Guarro, G. Martínez-Cadena & A. Di Pietro, (2008) Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cellular microbiology* **10**: 1339-1351.
- Marzluf, G. A., (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 17-32.

- Mayorga, M. E. & S. E. Gold, (2001) The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Molecular microbiology* **41**: 1365-1379.
- McMillan, J. N., M. S. Longtine, R. A. L. Sia, C. L. Theesfeld, E. S. G. Bardes, J. R. Pringle & D. J. Lew, (1999) The morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: cell cycle control of Swe1p degradation by Hsl1p and Hsl7p. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 6929-6939.
- Mendgen, K., M. Hahn & H. Deising, (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* **34**: 367-386.
- Mes, J. J., E. A. Weststeijn, F. Herlaar, J. J. M. Lambalk, J. Wijbrandi, M. A. Haring & B. J. C. Cornelissen, (1999) Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* **89**: 156-160.
- Mey, G., K. Held, J. Scheffer, K. B. Tenberge & P. Tudzynski, (2002a) CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Molecular microbiology* **46**: 305-318.
- Mey, G., B. Oeser, M. H. Lebrun & P. Tudzynski, (2002b) The biotrophic, non-appressorium-forming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a Fus3/Pmk1 homologous mitogen-activated protein kinase for colonization of rye ovarian tissue. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 303-312.
- Michielse, C. B., L. Reijnen, C. Olivain, C. Alabouvette & M. Rep, (2012) Degradation of aromatic compounds through the beta-ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular plant pathology* **13**: 1089-1100.
- Michielse, C. B. & M. Rep, (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* **10**: 311-324.
- Michielse, C. B., R. van Wijk, L. Reijnen, B. J. Cornelissen & M. Rep, (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol* **10**: R4.
- Migdal, I., Y. Ilina, M. J. Tamás & R. Wysocki, (2008) Mitogen-activated protein kinase Hog1 mediates adaptation to G1 checkpoint arrest during arsenite and hyperosmotic stress. *Eukaryotic cell* **7**: 1309-1317.
- Miguel-Rojas, C. & C. Hera, (2013) Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCFFbp1-mediated proteolysis pathway in *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* **14**: 934-945.
- Mitchell, T. K. & R. A. Dean, (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **7**: 1869-1878.
- Miyara, I., C. Shnaiderman, X. Meng, W. A. Vargas, J. M. Diaz-Minguez, A. Sherman, M. Thon & D. Prusky, (2012) Role of nitrogen-metabolism genes expressed during pathogenicity of the alkalinizing *Colletotrichum gloeosporioides* and their differential expression in acidifying pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 1251-1263.
- Mollapour, M. & P. W. Piper, (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **6**: 1274-1280.
- Monge, R. A., E. Roman, C. Nombela & J. Pla, (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**: 905-912.
- Moriwaki, A., E. Kubo, S. Arase & J. Kihara, (2006) Disruption of SRM1, a mitogen-activated protein kinase gene, affects sensitivity to osmotic and ultraviolet stressors in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS microbiology letters* **257**: 253-261.
- Mösch, H.-U., E. Kübler, S. Krappmann, G. R. Fink & G. H. Braus, (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled Mitogen-activated Protein Kinase and cAMP Pathways during Invasive Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **10**: 1325-1335.

- Mösch, H.-U., R. L. Roberts & G. R. Fink, (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 5352-5356.
- Moss, M. O. & J. E. Smith, (1982) The applied mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, . In: The applied mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, . Cambridge University Press, pp.
- Moss, M. O. & J. E. Smith, (2011) The applied mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, September 1982. In: The applied mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, September 1982. Cambridge University Press, pp.
- Müller, P., G. Weinzierl, A. Brachmann, M. Feldbrügge & R. Kahmann, (2003) Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryotic cell* **2**: 1187-1199.
- Murray, M. G. & W. F. Thompson, (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* **8**: 4321-4326.
- Mylonakis, E., (2008) *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* **165**: 1-3.
- Nagahashi, S., T. Mio, N. Ono, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, H. Bussey & H. Yamada-Okabe, (1998) Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 425-432.
- Namiki, F., M. Matsunaga, M. Okuda, I. Inoue, K. Nishi, Y. Fujita & T. Tsuge, (2001a) Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 580-584.
- Namiki, F., M. Matsunaga, M. Okuda, I. Inoue, K. Nishi, Y. Fujita & T. Tsuge, (2001b) Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 580-584.
- Nasmyth, K. & L. Dirick, (1991) The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**: 995-1013.
- Navarro-Velasco, G. Y., R. C. Prados-Rosales, A. Ortiz-Urquiza, E. Quesada-Moraga & A. Di Pietro, (2011) *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **48**: 1124-1129.
- Nucci, M. & E. Anaissie, (2002) Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases* **35**: 909-920.
- Nucci, M. & E. Anaissie, (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews* **20**: 695-704.
- O'Rourke, S. M. & I. Herskowitz, (2002) A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Molecular and cellular biology* **22**: 4739-4749.
- O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik & R. C. Ploetz, (1998) 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.
- Ochiai, N., T. Tokai, T. Nishiuchi, N. Takahashi-Ando, M. Fujimura & M. Kimura, (2007) Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemical and biophysical research communications* **363**: 639-644.
- Olivain, C. & C. Alabouvette, (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non pathogenic strain. *New Phytologist* **141**: 497-510.
- Olivain, C., S. Trouvelot, M.-N. Binet, C. Cordier, A. Pugin & C. Alabouvette, (2003) Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and environmental microbiology* **69**: 5453-5462.

- Orlova, M., E. Kanter, D. Krakovich & S. Kuchin, (2006) Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **5**: 1831-1837.
- Ortoneda, M., J. Guarro, M. P. Madrid, Z. Caracuel, M. I. G. Roncero, E. Mayayo & A. Di Pietro, (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity* **72**: 1760-1766.
- Ospina-Giraldo, M. D., E. Mullins & S. Kang, (2003) Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Current genetics* **44**: 49-57.
- Ozaki, K., K. Tanaka, H. Imamura, T. Hihara, T. Kameyama, H. Nonaka, H. Hirano, Y. Matsuura & Y. Takai, (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **15**: 2196.
- Palková, Z., J. Blanka Janderová & rcirc, (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**: 532-536.
- Palková, Z., F. Devaux, M. Rícirová, L. Mináriková, S. Le Crom & C. Jacq, (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular biology of the cell* **13**: 3901-3914.
- Pareja-Jaime, Y., M. Martín Urdiroz, M. I. G. Roncero, J. A. González Reyes & M. D. C. R. Roldán, (2010) Chitin synthase deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild type infection. *Molecular plant pathology* **11**: 479-493.
- Pareja-Jaime, Y., M. I. G. Roncero & M. d. C. Ruiz-Roldán, (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 728-736.
- Park, G., K. S. Bruno, C. J. Staiger, N. J. Talbot & J.-R. Xu, (2004a) Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. *Molecular microbiology* **53**: 1695-1707.
- Park, G., C. Xue, X. Zhao, Y. Kim, M. Orbach & J.-R. Xu, (2006) Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **18**: 2822-2835.
- Park, S.-M., E.-S. Choi, M.-J. Kim, B.-J. Cha, M.-S. Yang & D.-H. Kim, (2004b) Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. *Molecular microbiology* **51**: 1267-1277.
- Payne, D. M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber & T. W. Sturgill, (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO journal* **10**: 885.
- Perez-Nadales, E. & A. Di Pietro, (2011) The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant cell* **23**: 1171-1185.
- Perez-Nadales, E. & A. Di Pietro, (2014) The transmembrane protein Sho1 cooperates with the mucin Msb2 to regulate invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*.
- Peter, M., A. Gartner, J. Horecka, G. Ammerer & I. Herskowitz, (1993) FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* **73**: 747-760.
- Peter, M. & I. Herskowitz, (1994) Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**: 181-184.
- Philip, B. & D. E. Levin, (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and cellular biology* **21**: 271-280.
- Pietro, A. D., M. P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana & M. I. G. Roncero, (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology* **4**: 315-325.
- Posas, F. & H. Saito, (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.

- Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai & H. Saito, (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Powell, W. A. & H. C. Kistler, (1990) *In vivo* rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *Journal of bacteriology* **172**: 3163-3171.
- Pradel, E. & J. J. Ewbank, (2004) Genetic models in pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 347-363.
- Prados-Rosales, R. C. & A. Di Pietro, (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 162-171.
- Prados-Rosales, R. C., R. Roldan-Rodriguez, C. Serena, M. S. Lopez-Berges, J. Guarro, A. Martinez-del-Pozo & A. Di Pietro, (2012) A PR-1-like protein of *Fusarium oxysporum* functions in virulence on mammalian hosts. *The Journal of biological chemistry* **287**: 21970-21979.
- Prados-Rosales, R. C., C. Serena, J. Delgado-Jarana, J. Guarro & A. Di Pietro, (2006) Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes and infection* **8**: 2825-2831.
- Printen, J. A. & G. F. Sprague, (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-619.
- Prusky, D., J. L. McEvoy, R. Saftner, W. S. Conway & R. Jones, (2004) Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* **94**: 44-51.
- Puhalla, J. E., (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**: 461.
- Punt, P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemans, P. H. Pouwels & C. A. van den Hondel, (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the *hygromycin B* resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 117-124.
- Qi, M. & E. A. Elion, (2005) MAP kinase pathways. *Journal of cell science* **118**: 3569-3572.
- Ramos, B., F. M. Alves-Santos, M. A. García-Sánchez, N. Martín-Rodrigues, A. P. Eslava & J. M. Díaz-Mínguez, (2007) The gene coding for a new transcription factor (*ttf1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 864-876.
- Rep, M., M. Meijer, P. M. Houterman, H. C. Van Der Does & B. J. C. Cornelissen, (2005) *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular plant-microbe interactions* **18**: 15-23.
- Rep, M., H. C. Van Der Does, M. Meijer, R. Van Wijk, P. M. Houterman, H. L. Dekker, C. G. De Koster & B. J. C. Cornelissen, (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular microbiology* **53**: 1373-1383.
- Reyes, G., A. Romans, C. K. Nguyen & G. S. May, (2006) Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars. *Eukaryotic cell* **5**: 1934-1940.
- Rispail, N. & A. Di Pietro, (2009) *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 830-839.
- Rispail, N. & A. Di Pietro, (2010) The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* **11**: 395-407.
- Rispail, N., D. M. Soanes, C. Ant, R. Czajkowski, A. Grünler, R. Huguet, E. Perez-Nadales, A. Poli, E. Sartorel & V. Valiante, (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 287-298.
- Roberts, R. L. & G. R. Fink, (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & development* **8**: 2974-2985.

- Rodriguez-Galvez, E. & K. Mendgen, (1995) The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* **189**: 61-72.
- Rohde, J. R., R. Bastidas, R. Puria & M. E. Cardenas, (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in microbiology* **11**: 153-160.
- Rohde, J. R. & M. E. Cardenas, (2004) Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi. In: TOR. Springer, pp. 53-72.
- Roldán-Arjona, T., A. Pérez-Espinosa & M. Ruiz-Rubio, (1999) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular plant-microbe interactions* **12**: 852-861.
- Rollins, J. A. & M. B. Dickman, (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Applied and environmental microbiology* **67**: 75-81.
- Román, E., F. Cottier, J. F. Ernst & J. Pla, (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **8**: 1235-1249.
- Román, E., C. Nombela & J. Pla, (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular and cellular biology* **25**: 10611-10627.
- Römheld, V., C. Müller & H. Marschner, (1984) Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant physiology* **76**: 603-606.
- Rosales, R. C. P. & A. Di Pietro, (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 162-171.
- Rua, D., B. T. Tobe & S. J. Kron, (2001) Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Current opinion in microbiology* **4**: 720-727.
- Rui, O. & M. Hahn, (2007) The SlT2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Molecular plant pathology* **8**: 173-184.
- Ruiz-Roldan, C., Y. Pareja-Jaime, J.-A. Gonzalez-Reyes & M. I. G. Roncero, (2014) The transcription factor Con7-1 is a master regulator of morphogenesis and virulence in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Ruiz-Roldán, M. C., F. J. Maier & W. Schäfer, (2001) PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 116-125.
- Ruiz-Roldán, M. d. C., V. Garre, J. Guarro, M. a. Mariné & M. I. G. Roncero, (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 1227-1230.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*. Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York.
- Sanz, P., (2003) Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochemical Society Transactions* **31**: 178-181.
- Schäfer, K., J. M. Bain, A. Di Pietro, N. A. R. Gow & L. P. Erwig, (2014a) Hyphal growth of phagocytosed *Fusarium oxysporum* causes cell lysis and death of murine macrophages. *PLoS one* **9**: e101999.
- Schäfer, K., A. Di Pietro, N. A. R. Gow & D. MacCallum, (2014b) Murine Model for *Fusarium oxysporum* Invasive Fusariosis Reveals Organ-Specific Structures for Dissemination and Long-Term Persistence. *PLoS one* **9**: e89920.
- Schure, E. G., N. A. W. Riel & C. T. Verrips, (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **24**: 67-83.
- Segmüller, N., U. Ellendorf, B. Tudzynski & P. Tudzynski, (2007) BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic cell* **6**: 211-221.
- Shnaiderman, C., I. Miyara, I. Kobilier, A. Sherman & D. Prusky, (2013) Differential activation of ammonium transporters during the accumulation of ammonia by *Colletotrichum gloeosporioides* and its Effect on appressoria formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 345-355.
- Shock, T. R., J. Thompson, J. R. Yates & H. D. Madhani, (2009) Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and

- the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryotic cell* **8**: 606-616.
- Shulewitz, M. J., C. J. Inouye & J. Thorner, (1999) Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**: 7123-7137.
- Smith, D. G., M. D. Garcia-Pedrajas, W. Hong, Z. Yu, S. E. Gold & M. H. Perlin, (2004) An ste20 homologue in *Ustilago maydis* plays a role in mating and pathogenicity. *Eukaryotic cell* **3**: 180-189.
- Smith, S. E., C. Csank, G. Reyes, M. A. Ghannoum & V. Berlin, (2002) *Candida albicans* RHO1 is required for cell viability *in vitro* and *in vivo*. *FEMS yeast research* **2**: 103-111.
- Tae Kim, Y., D. Prusky & J. A. Rollins, (2007) An activating mutation of the *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene increases oxalic acid production at low pH but decreases virulence. *Molecular plant pathology* **8**: 611-622.
- Takano, Y., T. Kikuchi, Y. Kubo, J. E. Hamer, K. Mise & I. Furusawa, (2000) The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Molecular plant-microbe interactions* **13**: 374-383.
- Tatebayashi, K., K. Tanaka, H.-Y. Yang, K. Yamamoto, Y. Matsushita, T. Tomida, M. Imai & H. Saito, (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO journal* **26**: 3521-3533.
- Teichert, S., J. C. Rutherford, M. Wottawa, J. Heitman & B. Tudzynski, (2008) Impact of ammonium permeases MepA, MepB, and MepC on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic cell* **7**: 187-201.
- ten Have, A., W. O. Breuil, J. P. Wubben, J. Visser & J. A. L. van Kan, (2001) *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. *Fungal Genetics and Biology* **33**: 97-105.
- Teunissen, H., J. Verkoijen, B. Cornelissen & M. Haring, (2002) Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics* **268**: 298-310.
- Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Peñalva & H. N. Arst Jr, (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO journal* **14**: 779.
- Torres, A. M., N. F. Weeden & A. Martin, (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 937-945.
- Truckses, D. M., L. S. Garrenton & J. Thorner, (2004) Jekyll and Hyde in the microbial world. *Science* **306**: 1509-1511.
- Turrà, D., D. Segorbe & A. Di Pietro, (2014) Protein Kinases in Plant Pathogenic Fungi: Conserved Regulators of Infection. *Annual Review of Phytopathology* **52**.
- Tyers, M. & B. Futcher, (1993) Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Molecular and cellular biology* **13**: 5659-5669.
- Vadaie, N., H. Dionne, D. S. Akajagbor, S. R. Nickerson, D. J. Krysan & P. J. Cullen, (2008) Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *The Journal of cell biology* **181**: 1073-1081.
- Valiante, V., T. Heinekamp, R. Jain, A. Härtl & A. A. Brakhage, (2008) The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 618-627.
- Van Nguyen, T., W. Schäfer & J. Bormann, (2012) The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 1142-1156.
- Vartivarian, S. E., E. J. Anaissie & G. P. Bodey, (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clinical infectious diseases* **17**: S487-S491.

- Verstrepen, K. J. & F. M. Klis, (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology* **60**: 5-15.
- Vidal, S. E., D. Pincus, J. Stewart-Ornstein & H. El-Samad, (2013) Formation of Subnuclear Foci Is a Unique Spatial Behavior of Mating MAPKs during Hyperosmotic Stress. *Cell reports* **3**: 328-334.
- Vinod, P. K., N. Sengupta, P. J. Bhat & K. V. Venkatesh, (2008) Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of FLO11. *PLoS one* **3**: e1663.
- Vylkova, S. & M. C. Lorenz, (2014) Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. *PLoS pathogens* **10**: e1003995.
- Wang, Y. & H. G. Dohlman, (2004) Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. *Science* **306**: 1508-1509.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe & G. L. Johnson, (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* **79**: 143-180.
- Wiebe, M., (2002) Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology* **58**: 421-427.
- Wong, K. H., M. J. Hynes & M. A. Davis, (2008) Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic cell* **7**: 917-925.
- Wubben, J. P., A. ten Have, J. A. L. van Kan & J. Visser, (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Current Genetics* **37**: 152-157.
- Wullschleger, S., R. Loewith & M. N. Hall, (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484.
- Xu, F., A. E. Palmer, D. S. Yaver, R. M. Berka, G. A. Gambetta, S. H. Brown & E. I. Solomon, (1999) Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase axial perturbations of the T1 copper. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 12372-12375.
- Xu, J.-R. & J. E. Hamer, (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & development* **10**: 2696-2706.
- Xu, J.-R., C. J. Staiger & J. E. Hamer, (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 12713-12718.
- Xue, T., C. K. Nguyen, A. Romans & G. S. May, (2004) A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell* **3**: 557-560.
- Zapater, M., J. Clotet, X. Escoté & F. Posas, (2004) Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle* **4**: 6-7.
- Zarzov, P., C. Mazzoni & C. Mann, (1996) The SLT2 (MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *The EMBO journal* **15**: 83.
- Zhang, N., K. O'Donnell, D. A. Sutton, F. A. Nalim, R. C. Summerbell, A. A. Padhye & D. M. Geiser, (2006a) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 2186-2190.
- Zhang, N., K. O'Donnell, D. A. Sutton, F. A. Nalim, R. C. Summerbell, A. A. Padhye & D. M. Geiser, (2006b) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol* **44**: 2186-2190.
- Zhao, X., R. Mehrabi & J.-R. Xu, (2007) Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic cell* **6**: 1701-1714.
- Zheng, L., M. Campbell, J. Murphy, S. Lam & J.-R. Xu, (2000) The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 724-732.

Zheng, W., Z. Zhao, J. Chen, W. Liu, H. Ke, J. Zhou, G. Lu, A. G. Darvill, P. Albersheim & S. Wu, (2009) A Cdc42 ortholog is required for penetration and virulence of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 450-460.



Protein Kinases in Plant-Pathogenic Fungi: Conserved Regulators of Infection

David Turrà, David Segorbe, and Antonio Di Pietro

Departamento de Genética and Campus de Excelencia Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; email: ge3tutud@uco.es, b22selud@uco.es, ge2dipia@uco.es

Annu. Rev. Phytopathol. 2014. 52:13.1–13.22

The *Annual Review of Phytopathology* is online at phyto.annualreviews.org

This article's doi:
10.1146/annurev-phyto-102313-050143

Copyright © 2014 by Annual Reviews.
All rights reserved

Keywords

infection-related development, invasive growth, phosphorylation, penetration structure, signaling cascade

Abstract

Phytopathogenic fungi have evolved an amazing diversity of infection modes and nutritional strategies, yet the signaling pathways that govern pathogenicity are remarkably conserved. Protein kinases (PKs) catalyze the reversible phosphorylation of proteins, regulating a variety of cellular processes. Here, we present an overview of our current understanding of the different classes of PKs that contribute to fungal pathogenicity on plants and of the mechanisms that regulate and coordinate PK activity during infection-related development. In addition to the well-studied PK modules, such as MAPK (mitogen-activated protein kinase) and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-PKA (protein kinase A) cascades, we also discuss new PK pathways that have emerged in recent years as key players of pathogenic development and disease. Understanding how conserved PK signaling networks have been recruited during the evolution of fungal pathogenicity not only advances our knowledge of the highly elaborate infection process but may also lead to the development of novel strategies for the control of plant disease.

PKs: protein kinases

MAPK:
mitogen-activated
protein kinase

cAMP: cyclic
adenosine
monophosphate

PKA: protein kinase A

**Target of rapamycin
(TOR):** conserved
serine/threonine
protein kinase

INTRODUCTION

Protein kinases (PKs) are a major class of signaling molecules that catalyze reversible phosphorylation of a large proportion of cellular proteins (~30%), thereby modulating protein activity and gene expression (22). The coordinated action of multiple PK pathways integrates a variety of external and internal cues to orchestrate key processes of the fungal life cycle, such as isotropic or polar growth, nutrient or stress responses, and asexual or sexual development.

Fungal plant pathogens cause devastating diseases on a wide range of crops, leading to significant agricultural losses. Although these agents have evolved an amazing diversity of infection modes and nutritional strategies, the underlying cellular signaling events, including protein phosphorylation/dephosphorylation cycles, are remarkably conserved. The pivotal role of fungal PKs in plant infection was discovered approximately 20 years ago, when key components of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-dependent protein kinase [protein kinase A (PKA)] pathways were shown to be essential for infection-related morphogenesis and virulence (5, 41, 42, 92, 152). In addition to these well-conserved PK modules, additional kinases with distinct roles in fungal pathogenicity on plants have been discovered during the past decade, thanks to the functional insights from the model *Saccharomyces cerevisiae* and to the availability of fungal genome sequences. Recently, the first functional analysis of the complete kinome in a plant-infecting fungus was reported (147).

In the present review, we provide an overview of the different classes of PKs that govern fungal pathogenicity on plants. We discuss recent advances in our understanding of the cellular mechanisms that regulate and coordinate PK activity during infection and also highlight new PKs that have emerged in recent years as key players of pathogenic development and disease.

MAPK CASCADES: FROM EXTRACELLULAR SIGNALS TO PATHOGENICITY RESPONSES

MAPK cascades are three-tiered PK modules that are present in all eukaryotic organisms and function in succession to transmit a variety of cellular signals (150). The MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) phosphorylates the MAP kinase kinase (MAPKK), which in turn activates the MAPK by dual phosphorylation of a pair of conserved threonine and tyrosine residues. MAPK cascades govern a variety of cellular responses, ranging from proliferation and differentiation to stress adaptation and programmed cell death.

Most fungal pathogens contain three MAPKs that are orthologs of the *S. cerevisiae* Fus3/Kss1, Slt2, and Hog1 MAPKs, and function in separate signaling cascades to regulate infection-related morphogenesis, cell wall remodeling, and high osmolarity stress response, respectively (45, 120, 166). Although all three MAPK pathways contribute to virulence on plants, each of them has distinct and sometimes even opposite functions during the infection process. There is also evidence for cross talk between different fungal MAPK cascades and between MAPK and other key signaling pathways, such as the cAMP-PKA and the target of rapamycin (TOR) pathway (52, 62, 81, 93, 126).

Pathogenicity MAPK: Control of Infection-Related Morphogenesis and Invasive Growth

In *S. cerevisiae*, the Kss1 MAPK cascade is essential for filamentation and invasive growth on agar plates (77). In a landmark paper, Xu & Hamer (152) reported the first mutational analysis of a MAPK in a fungal pathogen, the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Deletion of the Kss1 ortholog (denominated “pathogenicity MAPK”) caused inability to differentiate the characteristic

dome-shaped penetration structures called appressoria and led to a complete loss of pathogenicity on rice plants. Kinase-dead or nonphosphorylatable MAPK alleles failed to complement the *kss1* deletion mutant, confirming that enzymatic MAPK activity and phosphorylation by the upstream MAPKK component are required for pathogenicity functions (10).

Kss1 orthologs were subsequently shown to be essential for plant infection in phylogenetically and biologically diverse phytopathogens, including appressorium-forming species, such as *Cochliobolus heterostrophus* (69), *Colletotrichum orbiculare* (138), and *Pyrenophora teres* (125), among others. In *M. oryzae* and *C. heterostrophus*, MAPK fused to the green fluorescent protein (GFP) accumulated predominantly in the nucleus of the appressorium, suggesting that local MAPK accumulation may be associated with its activation during host infection (10, 70). The corn smut pathogen *Ustilago maydis* has two Kss1-type MAPKs with partially overlapping functions, and thus only the double knockout mutant was fully impaired in pathogenicity (9, 84, 96).

Importantly, *M. oryzae kss1* mutants even failed to infect rice leaves through wounds, suggesting that the function of Kss1 in pathogenicity reaches beyond the differentiation of penetration structures (152). Indeed, Kss1 was found to be required for infection in all phytopathogens tested so far, including many species that do not form classical appressoria, such as *Botrytis cinerea* (168), *Fusarium oxysporum* (31), *Claviceps purpurea* (89), and *Fusarium graminearum* (55), or other obligate biotrophs such as *Puccinia graminis* (107). Currently, this MAPK is considered as a central regulator of infectious growth on living plant tissue and likely represents the most universally studied pathogenicity factor in fungi.

Additional components of the Kss1 MAPK module, such as the upstream MAPKK Ste7, the MAPKKK Ste11, and the adaptor protein Ste50, were also essential for differentiation of penetration structures and plant infection in different pathogens (3, 5, 53, 97, 109, 131, 134, 165). Physical interaction between Ste11, Ste7, and Ste50 was demonstrated in *M. oryzae* (109), and Ste7 was found to interact with Kss1 during appressorium formation (167). Expression of a dominant activating (DA) *ste7* allele restored appressorium formation in *ste11*, *ste7*, and *ste50* mutants but not in the *kss1* mutant, placing Ste11, Ste7, and Ste50 upstream of the MAPK. Importantly, the appressoria induced by DA *ste7* in *M. oryzae* were not functional in the penetration of rice leaves (165). This suggests that precise regulation of MAPK phosphorylation/dephosphorylation cycles is essential for appressorium function. Meanwhile, epistasis analysis in *U. maydis* with null or DA alleles of *ste11* and *ste7* confirmed that these components function in a signaling module upstream of the two Kss1 paralogs (3, 5, 42, 97), and that Ste7 phosphorylates both MAPKs (22, 97). Collectively, these studies provide compelling evidence for a broadly conserved role of the Ste11-Ste7-Kss1 MAPK module during invasive growth and infection on plants (**Figure 1**).

The mechanisms that modulate the activity of the pathogenicity MAPK cascade during fungal infection have been only partly characterized. A p21-activated protein kinase (PAK) Ste20 functions upstream of the Kss1 MAPK module in regulation of cytokinesis, hyphal growth, and differentiation (8). *U. maydis ste20* mutants showed a delay in the mating response and reduced virulence, but in contrast to mutations in the core components of the MAPK module, *ste20* mutations did not suppress the constitutive filamentous phenotype of an adenylate cyclase (AC) mutant (135). Two PAKs orthologous to Ste20 and Cla4 were examined as possible components upstream of the Kss1 MAPK module in *M. oryzae* (75). Ste20 was dispensable for plant infection, whereas the *cla4* mutant produced nonfunctional appressoria but was still able to infect through wounds (75). Thus, a direct connection of Ste20 or Cla4 to MAPK-mediated regulation of pathogenicity has not been established at present.

The small guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein Ras2 activates the filamentation and invasive growth MAPK cascade of *S. cerevisiae* upstream of Ste20 and Kss1 (94). Pharmacological inhibition of Ras or expression of a dominant negative *ras* allele in *Sclerotinia sclerotiorum*

Appressoria:

specialized cells used to penetrate the host surface through generation of enormous turgor pressure

PAK: p21-activated protein kinase

AC: adenylate cyclase

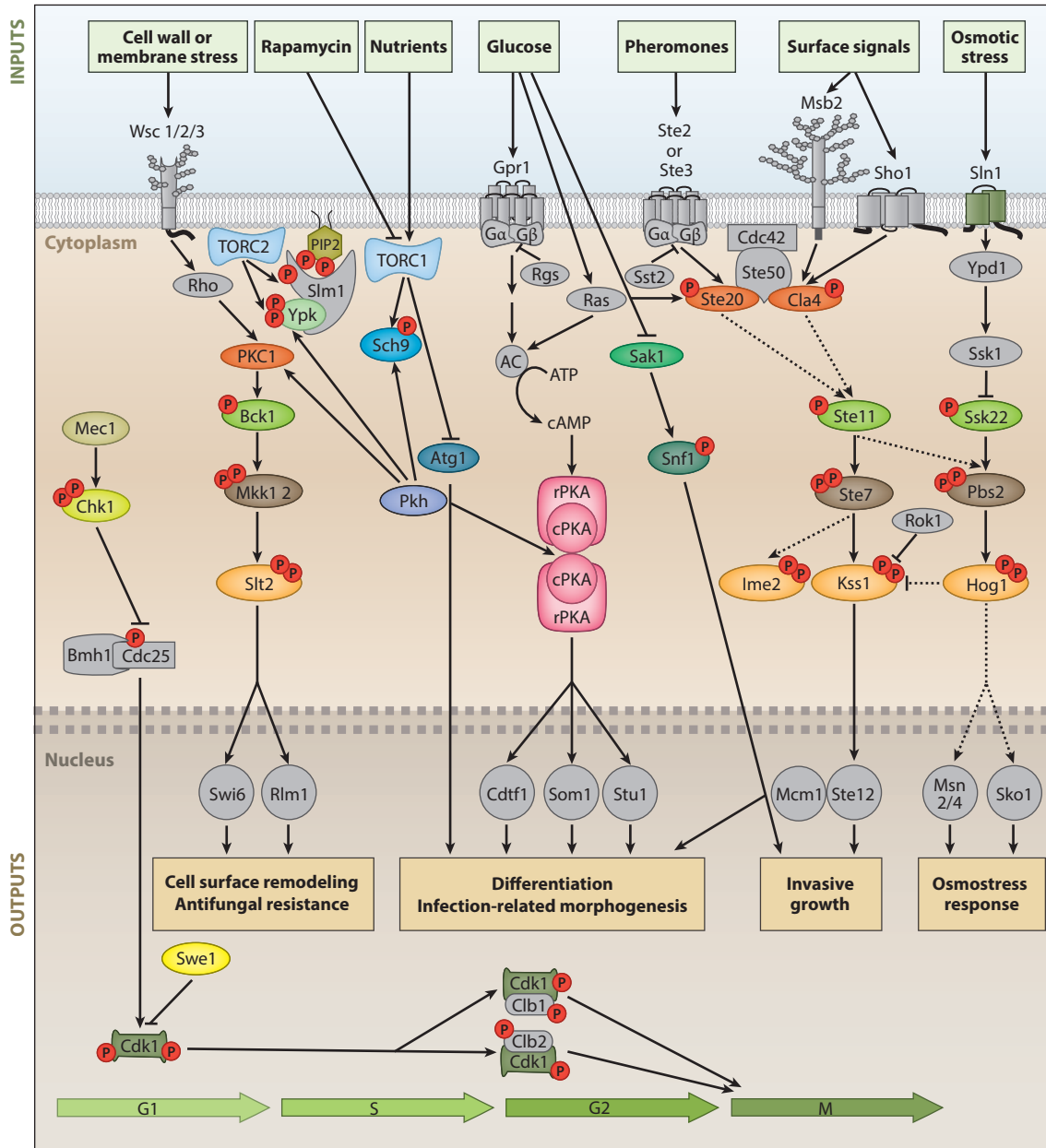


Figure 1

Protein kinase (PK) pathways in plant-pathogenic fungi. Green boxes at the top represent different signaling inputs that are sensed by cell surface receptors and translated to the appropriate PK module(s). Regulatory components may be shared to allow cross talk between distinct pathways. Specificity is achieved through the use of scaffolding proteins, preventing leakage of the signal into competing pathways. Following activation, PKs phosphorylate a set of substrates, including transcriptional regulators that generate distinct pathogenicity-related outputs (*tan boxes*). PKs are shown in color; additional key signaling components are shown in gray. Arrows and bars denote positive and negative interactions, respectively. Solid arrows and bars refer to direct interactions; dashed arrows and bars refer to indirect and/or potential interactions. Red circles containing the letter P denote phosphorylated amino acid residues. Abbreviations: AC, adenylate cyclase; cPKA/rPKA, protein kinase A catalytic/regulatory subunit; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; TORC1/TORC2, target of rapamycin complex 1/2.

caused a decrease in Kss1 phosphorylation (17). Deletion of *ras2* in *F. graminearum* also led to reduced levels of Kss1 phosphorylation and attenuated virulence (7). However, DA *ras2* stimulated Kss1-dependent filamentation in *U. maydis* and appressorium formation in *M. oryzae* (65, 109).

In *Colletotrichum trifolii*, Ras was found to interact with Rac1, another small GTPase that functions in actin organization and polarized cell growth. Expression of a dominant negative *rac1* allele caused a dramatic reduction in hyphal growth (16). *U. maydis rac1* mutants were impaired in filamentation and failed to cause tumors on corn, whereas *rac1* overexpression triggered filament formation in the wild-type strain but not in a *cla4* mutant, suggesting that Cla4 mediates filamentation downstream of Rac1 (82). In line with this idea, *cla4* strains were impaired in morphogenesis, mating, and plant infection (71). In *C. purpurea*, Rac1 and Cla4 interact and have overlapping functions in hyphal polarity, development, and pathogenicity (123). *M. oryzae rac1* deletion mutants or dominant negative mutants were defective in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity, whereas expression of DA *rac1* resulted in abnormally large conidia that formed defective appressoria (18). Taken together, these findings suggest that Ras, and possibly Rac1, function as activators of the pathogenicity MAPK cascade in fungal pathogens.

Interestingly, Rac1 also interacted in vitro with two NADPH-dependent oxidases (NOXs), Nox1 and Nox2 (18). NOXs generate reactive oxygen species (ROS), using electrons derived from intracellular NADPH (49). ROS production was significantly reduced in a *rac1* deletion mutant and increased in a DA *rac1* mutant (18). NOXs are required for infection-related development and pathogenicity in *M. oryzae* (36) and other plant pathogens (49), suggesting a possible function of NOXs and ROS in MAPK regulation. In support of this idea, genetic analysis in the saprophyte *Podospira anserina* suggested that Nox1 is required for differentiation of fruiting bodies and invasion structures on solid cellulosic substrate and may function upstream of the Ste11 MAPKKK (83).

Two transmembrane proteins, the highly glycosylated mucin Msb2 and the tetraspan adaptor Sho1 were shown to function at the head of the Kss1 pathway in *U. maydis*, *M. oryzae*, and *F. oxysporum* (64, 80, 112). Msb2 and Sho1 have partly overlapping functions in surface-mediated stimulation of Kss1 phosphorylation, differentiation of infection structures, and plant invasion. However, the pathogenicity phenotypes of the single and double mutants were less severe than those of the Kss1 mutants, suggesting the presence of additional upstream regulators. The conserved transmembrane protein Pic5 of *M. oryzae*, for example, was identified during a screen for Kss1-interacting proteins and regulates conidiation and appressorium differentiation (164). The dual specificity phosphatase Rok1 acts as a negative regulator of Kss1 MAPK during mating and pathogenicity in *U. maydis* (22).

The homeodomain transcription factor Ste12 governs Kss1-driven filamentous growth in *S. cerevisiae* (77). Ste12 orthologs in plant-pathogenic fungi have broadly conserved roles in virulence and most likely operate downstream of Kss1. Although *ste12* mutants are still able to perform part of the MAPK-regulated functions, such as appressorium differentiation, conidiation, and vegetative hyphal fusion, they are dramatically impaired in invasive growth on the host plant (27, 108, 110, 118, 131, 141, 151). For example, appressoria formed by the *M. oryzae ste12* mutant fail to form a penetration peg because of a defect in microtubule reorganization (108). In *F. oxysporum*, *ste12* mutants are unable to penetrate across cellophane membranes, similar to the *kss1* mutants (118). Thus, Ste12 specifically governs MAPK outputs related to invasive growth and pathogenicity. Additional MAPK-dependent functions are likely controlled by other transcription factors, such as the conserved MADS-box protein Mcm1, which interacts with Ste12 and regulates male fertility and conidiation in *M. oryzae* while partially contributing to appressorium penetration (169).

An additional MAPK-like PK, Crk1, was originally identified in *U. maydis* (39). Crk1 is an ortholog of Ime2, which stimulates meiosis in *S. cerevisiae*. *U. maydis* Ime2 is activated via phosphorylation of a TXY motif by the MAPKK Ste7, and promotes mating and plant infection

NADPH-dependent oxidases (NOXs):
superoxide-generating enzyme systems

ROS: reactive oxygen species

through the transcriptional regulator Prf1. Importantly, Ime2 proteins are widely conserved in phytopathogenic fungi and can thus be considered as a new family of MAPKs (39, 45). However, additional studies are required to confirm their functional link to the Kss1 signaling cascade and their potential role in plant infection.

Undoubtedly, the aspect of the Kss1 pathway that has most attracted the interest of fungal biologists and plant pathologists is its evolutionarily conserved function in plant infection. Although the exact role of this MAPK in pathogenicity is still not fully understood, it is clearly involved in different steps of infection, including physical and chemical sensing of the host (64, 80, 112), differentiation of infection structures (152), reorganization of the actin cytoskeleton during host penetration (110), invasive growth on living host tissue (31, 152), and expression of secreted plant cell wall-degrading enzymes (CWDEs) (31, 56, 68, 118, 164) as well as others that likely remain to be discovered. Besides plant pathogenicity, the Kss1 cascade also controls complex developmental processes, such as conidiation (55, 69, 125, 134), sexual development (53, 55, 69, 96), and vegetative hyphal fusion (114), but is largely dispensable for vegetative hyphal growth, particularly during submerged culture. Interestingly, Kss1 orthologs are also dispensable for fungal infection of mammals and invertebrates (26, 100, 105). This MAPK cascade therefore provides a fascinating example that illustrates how a conserved signaling pathway for developmental transitions in fungi has been recruited during evolution of pathogenicity to govern infection-related development and invasive growth on the plant host.

Cell Integrity MAPK: Remodeling of the Cell Surface and Evasion of the Plant Immune Response

The fungal cell wall is a highly dynamic organelle whose molecular composition, organization, and thickness vary considerably depending on environmental conditions. In *S. cerevisiae*, the MAPK Slt2 regulates wall remodeling during the cell cycle and upon different stresses by orchestrating cell wall biosynthesis and actin organization as well as other events that maintain cell integrity (72). Mutants of *M. oryzae* or *F. graminearum* that lacking the *slt2* ortholog displayed normal hyphal growth in liquid culture but severely restricted colonies on solid media, which could be partially restored by an osmotic stabilizer such as sorbitol (51, 153). Along with its role in vegetative growth, Slt2 is also required for developmental processes such as conidiation (61, 88, 124, 153), female fertility (51, 153), and vegetative hyphal fusion (51).

Although the *slt2* mutants still produce melanized appressoria, they are impaired in penetration and colonization of the host tissue as well as virulence (61, 88, 124, 153). *M. oryzae* strains lacking the MAPKKK Bck1 displayed a similar phenotype as *slt2* mutants, suggesting that the cell integrity MAPK module is conserved in fungal pathogens (57). The complete three-tiered Slt2 MAPK module was recently characterized in *U. maydis* and found to promote escape from the G2 phase of the cell cycle (12). Two putative downstream components, the MADS-box transcription factor Rlm1 and the transcription cofactor Swi6, were shown to interact with Slt2 in *M. oryzae*, and Rlm1 was found to localize to nuclei in conidia, appressoria, and infectious hyphae (85, 115). Similar to the *slt2* mutant, *rlm1* strains also formed melanized appressoria but were blocked in differentiation of infectious hyphae inside the plant (85). Likewise, *swi6* mutants had defects reminiscent of the *slt2* strain, including reduced surface growth, abnormal formation of conidia and appressoria, impaired appressorium function, and defects in cell integrity, indicating that Rlm1 and Swi6 have partially overlapping functions downstream of Slt2 (115). Taken together, these findings suggest that the cell-integrity MAPK cascade is instrumental for host penetration but is also required for the subsequent steps of infection that lead to successful establishment of the fungus-plant interaction (**Figure 1**).

What is the possible function of Slt2 during plant colonization? In contrast to the *kss1* mutant, the *slt2* mutant of *M. oryzae* triggered rapid plant defense responses underneath the appressorium (153). Slt2 has a protective role against the CWDEs glucanase and chitinase (51, 87, 88, 153), as well as against other components of the plant immune response, such as plant antimicrobial peptides (116) or phytoalexins (58). Importantly, the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin triggered rapid phosphorylation of Slt2 in *Alternaria brassicicola* (58). Moreover, the development of infectious hyphae by the *M. oryzae rlm1* mutant was blocked in living plant cells but not in heat-killed cells or cellophane membranes (85). These findings suggest that the Slt2 pathway is activated by plant defense compounds and contributes to protecting the fungus from the potentially deleterious effects of the host immune response.

High Osmolarity MAPK: Osmostress Response During Host Penetration

The high osmolarity glycerol (Hog1) MAPK governs adaptive responses to hyperosmotic stress, including the synthesis and accumulation of the compatible osmolyte glycerol, changes in the global pattern of gene expression, and temporary cell cycle arrest (127). Deletion of *hog1* orthologs in fungal plant pathogens results in increased sensitivity to hyperosmotic stress (32, 52, 111, 133, 143) due to a defect in accumulation of compatible solutes (32). Hog1 is rapidly phosphorylated upon hyperosmotic stress (52, 76, 133). Interestingly, Hog1 phosphorylation is also stimulated by phenylpyrrole and dicarboximide fungicides (76), and *hog1* mutants are highly resistant against these classes of compounds (76, 133, 143).

Surprisingly, glycerol accumulation and appressorium turgor were unaltered in *M. oryzae hog1* mutants that were fully pathogenic (32). By contrast, Hog1 was important for virulence in other plant-pathogenic fungi (52, 76, 111, 133, 143). *C. heterostrophus hog1* mutants produced smaller appressoria and caused attenuated disease symptoms on maize (52), whereas *F. graminearum hog1* deletion strains were blocked in sexual development and impaired in invasive growth on maize and wheat (143). *B. cinerea* Hog1 was phosphorylated and translocated to the nucleus during early stages of infection (48) and was required for penetration into the host tissue (133). Mutants lacking the upstream MAPKKK Ssk2 or MAPKK Pbs2 failed to phosphorylate Hog1 upon osmotic stress and displayed growth and virulence phenotypes similar to those of *hog1* mutants (155, 157). Thus, the Hog1 cascade is essential for the response to hyperosmotic stress and contributes to host penetration and virulence in plant pathogens (**Figure 1**). However, in spite of being one of the best-understood eukaryotic signaling pathways, the exact contribution of the Hog1 cascade to fungal infection of plants still remains to be elucidated.

cAMP-PKA PATHWAY: NUTRIENT-DEPENDENT CONTROL OF CELL SHAPE

PKA is a serine/threonine protein kinase that serves as the main intracellular target of cAMP and consists of two catalytic (cPKA) and two regulatory (rPKA) subunits. Binding of cAMP to rPKAs alleviates their inhibitory activity and releases the cPKAs, which phosphorylate a set of target proteins (121).

In *U. maydis*, cAMP-PKA controls the morphogenetic transition between budding and filamentous growth, a prerequisite for mating and infection. High glucose concentrations lead to increased intracellular cAMP levels and trigger budding, whereas nutrient limitation and exposure to air or acid pH result in low cAMP levels and filamentous growth (41, 42). Loss of AC or cPKA produces constitutively filamentous growth (35, 41), which can be reversed by exogenous cAMP

or mutation of rPKA (41). Importantly, AC, cPKA, and rPKA are all required for tumor formation in corn, and this function is independent of their role in sexual development (35).

In *M. oryzae*, intracellular cAMP levels mediate recognition of the plant surface and stimulate infection-related development. Addition of cAMP triggers appressorium differentiation on noninducing hydrophilic surfaces (67). Molecular characterization of AC, rPKA, or the cAMP-hydrolyzing enzyme phosphodiesterase confirmed the crucial role of cAMP-PKA signaling in host recognition and appressorium differentiation (21, 92, 117). *C. trifolii* and *Colletotrichum gloeosporioides* mutants lacking AC or cPKA still formed appressoria but failed to penetrate the leaf surface (154, 158). Loss of cPKA or rPKA in the dimorphic pathogen *M. graminicola* led to a defect in filamentation and a reduction in disease symptoms (86). *B. cinerea* mutants lacking AC, cPKA, or rPKA showed a decrease in penetration efficiency and host plant infection (33). In the soilborne pathogen *Verticillium dahliae*, deletion of cPKA caused a reduction in vascular colonization and disease symptoms (142). The cAMP-PKA pathway therefore functions as a central regulator of infection-related development in plant-pathogenic fungi (**Figure 1**).

AC activity in *S. cerevisiae* is regulated by intra- and extracellular glucose through two parallel pathways, the small GTP-binding protein Ras and the seven transmembrane receptor Gpr1, which interacts with heterotrimeric G proteins (162). *U. maydis* mutants lacking the G protein α subunit Gpa3 were sterile, nonpathogenic, and exhibited colony morphology similar to AC mutants that could be rescued by exogenous cAMP (62). A DA *gpa3* allele caused a glossy colony phenotype and an inability to proliferate inside the plant (63). *B. cinerea* mutants lacking either G α 3, Ras, or AC exhibited a defect in carbon source-induced germination, which was restored by cAMP (33, 132). *M. oryzae* mutants lacking the G α subunit MagB or the G β subunit Mgb1 had reduced intracellular cAMP levels and defects in appressorium formation and virulence (79, 103). Expression of multiple G β copies or DA Ras2 or deletion of the negative regulator of G protein–signaling Sst2 resulted in elevated intracellular cAMP levels and formation of appressoria on noninducing surfaces (74, 78, 103). Taken together, these results provide strong evidence for a function of Ras and heterotrimeric G proteins upstream of the cAMP-PKA pathway (**Figure 1**).

The AC-associated and actin-binding protein CAP1 was recently shown to contribute to AC activation in *M. oryzae*. Deletion of *cap1* reversed the effects of DA Ras2, causing reduced intracellular cAMP levels, defective appressorium morphogenesis, and a lack of plant infection (170). The phosphatase-like protein Bdm1 from *Cryphonectria parasitica* was required for stability of the G β subunit (128) and was phosphorylated by casein kinase 2 (CK2) in vitro. Mutation of CK2 phosphorylation sites in Bdm1 caused a decrease in virulence, suggesting that CK2 might contribute to regulation of the cAMP-PKA cascade (128).

Putative downstream transcription factors of the cAMP-PKA pathway have been identified in *M. oryzae*. Som1 and Cdtf1 were required for development of conidia and appressoria, and their transcript levels were positively regulated by AC and PKA (156). Som1 interacted with Cdtf1 and Stu1, an ortholog of the *S. cerevisiae* APSES-type transcription factor Efg1, which also functions downstream of the PKA pathway. Moreover, the Stu1 ortholog of *C. gloeosporioides* was required for appressorium penetration and differentiation of asexual and sexual reproductive structures (139).

Cross talk between the cAMP-PKA and the Kss1 MAPK pathway has been reported in *S. cerevisiae* and *U. maydis* (42, 63, 93). The high mobility group (HMG) domain transcription factor Prf1 orchestrates pheromone signaling, filamentous growth, and pathogenic development of *U. maydis* downstream of the cAMP-PKA and Kss1 MAPK pathways (47). Prf1 interacts with both PKA and Kss1 and contains functional phosphorylation sites that are modified by these two PKs, thereby integrating signals from the two pathways (59). In conclusion, the cAMP-PKA pathway functions as a conserved regulator of fungal cell differentiation and cooperates with the Kss1 MAPK cascade in the control of key developmental transitions during plant infection.

TOR KINASE: BALANCING CELL GROWTH, DIFFERENTIATION, AND STRESS RESPONSE

The essential serine-threonine kinase TOR is the central component of a eukaryotic signaling pathway that controls cell growth and proliferation in response to nutrients (54). TOR forms two dimeric complexes: TORC1, which is sensitive to the specific inhibitor rapamycin, and TORC2, which is not. TORC1 promotes cell growth by stimulating anabolic processes, such as protein synthesis and ribosome biogenesis. Inhibition of TORC1 by carbon or nitrogen starvation and exposure to different stresses or rapamycin trigger catabolic processes, such as autophagy, stress responses, and cell cycle arrest (54).

Recent findings suggest a role of TOR in fungal pathogenicity on plants. In *F. oxysporum*, as well as in *F. graminearum* and *M. oryzae*, virulence-related functions, such as penetration across cellophane membranes, which depend on the Kss1 MAPK cascade, are repressed in the presence of the preferred nitrogen source ammonium (81). This repression is reversed by rapamycin, suggesting that TOR is a negative regulator of Kss1-driven virulence-related processes in plant pathogens.

Several TOR-dependent functions are mediated by the AGC kinase Sch9, which is directly phosphorylated by TOR (54). Although Sch9 has not been examined so far in plant pathogens, its deletion in the dimorphic human pathogen *Candida albicans* caused a hyperfilamentous phenotype under hypoxic conditions, which could be mimicked by adding rapamycin to the wild-type strain. This is in line with the idea that TOR negatively regulates filamentation, a key virulence trait of *C. albicans*, via Sch9 (137).

TORC1 also cooperates with PKA to inhibit autophagy, a broadly conserved catabolic process involved in differentiation, development, and cell death (54). TORC1 prevents activation of the PK Atg1, which initiates formation of a double-membrane vesicle termed the autophagosome. *M. oryzae* mutants in *atg1* or any of the other 15 pathway genes necessary for nonselective macroautophagy fail to cause rice blast disease because of the impairment of appressorium maturation (60). Interestingly, infection-associated autophagy in *M. oryzae* requires the Kss1 MAPK, further supporting the case for contrasting roles of TOR and Kss1 in fungal pathogenicity (60).

HISTIDINE KINASES: OSMOSENSING AND BEYOND

Histidine kinases (HKs) function at the head of two-component phosphorelay systems (TCSs), a class of signaling modules present both in prokaryotes and eukaryotes. HKs are used by cells to sense a variety of environmental and intracellular stimuli, including nutrients, hormones, oxygen availability, and oxidative or osmotic stress (73). Fungal TCSs consist of multiple His-Asp phosphorelays with three functional modules: an upstream hybrid HK carrying both an HK domain and a C-terminal response regulator (RR) domain, an intermediate histidine-containing phosphotransfer (HPt) protein, and a downstream RR protein (73). *S. cerevisiae* has one HPt, one HK, and two RRs, whereas filamentous fungi generally contain multiple hybrid HKs and RRs, but only a single HPt (4, 14, 73). In the model ascomycete *Neurospora crassa*, 11 putative HKs have been identified, whereas the number is approximately double in most plant pathogens (14). Because several HK families are pathogen specific, it has been suggested that the increase in the number of HKs may reflect the need of fungal pathogens to adapt to the environmental niche of the host. The *S. cerevisiae* Sln1 TCS system is composed by the membrane-associated hybrid HK Sln1, the HPt Ypd1 and two functionally distinct RRs: Ssk1, which functions upstream of the Hog1 MAPK cascade, and Skn7, a transcriptional regulator of stress-induced genes (113).

In plant pathogens, the HK family orthologous to Sln1 (class VI) has only been examined in *M. oryzae* at present. Similar to *Hog1*, *M. oryzae* Sln1 is required for osmostress resistance, although

HK: histidine kinase

Two-component phosphorelay systems (TCSs): signaling modules used by cells to sense and respond to different environmental signals

RR: response regulator

HPt: histidine-containing phosphotransfer

there is evidence that it also functions in cell wall stress, appressorial turgor, and virulence, possibly through the Slr2 pathway (32, 163). The best-studied class of HKs in filamentous fungi is class III, whose first characterized member, *N. crassa* Nik-1/Os-1, regulates hyphal development and resistance against hyperosmotic stress (1). In several plant pathogens, deletion of the Nik1 ortholog leads to reduced osmotolerance and increased resistance to phenylpyrrole and dicarboximide fungicides. These phenotypes are similar to those of *bog1* mutants, indicating that class III HKs function upstream of the Hog1 cascade (20, 24, 95, 119, 145, 161). Moreover, class III HKs regulate morphogenetic events, such as conidiogenesis in *B. cinerea* (145) and dimorphic switching in human pathogens (2, 101). In some cases, deletion of the HK caused a reduction in virulence on the plant host (20, 119, 145). Thus, similar to the Hog1 MAPK, the importance of class III HKs in virulence varies between different fungus-host systems, most likely depending on the infection strategy of each pathogen.

Other than class III and VI, the only other type of HK studied so far in phytopathogens is class X. In *Schizosaccharomyces pombe*, this class of HKs contributes to the activation of Hog1 by osmotic or oxidative stress (11), but no such role was detected in *C. purpurea*. Deletion of HKs from this class in *C. purpurea* caused increased sensitivity to phenylpyrrole and dicarboximide fungicides, the opposite phenotype to class III HK mutants (99, 145). Importantly, loss of class X HKs resulted in significantly decreased virulence (99).

Downstream of Ypd1, up to four RRs (Ssk1, Skn7, Rim15, Rec1) have been identified in different fungal pathogens, but their physiological roles have been examined in only a few cases (14, 104). Skn7 is required for osmotic and oxidative stress response in *Alternaria alternata*, *C. heterostrophus*, and *F. graminearum* but is required for plant infection only in *A. alternata* (19, 104). A distinct RR, Ssk1, controls virulence in *C. heterostrophus* and *F. graminearum*, most likely via Hog1 (104). By contrast, deletion of the Rim15 and Rec1 RRs in these fungi had no detectable effect on virulence (104). Collectively, these findings suggest that HK classes III, VI, and X have both distinct and overlapping functions in plant infection, which differ depending on the pathogen-host system and are mostly, but not exclusively, linked to the Hog1 cascade and response to osmotic stress. Future studies on the biological role of the pathogen-specific classes of HKs (I, II, VII, and XI) should reveal whether these classes have evolved to perform novel functions in sensing and adaptation to the plant host environment.

SNF1 KINASE: BREAKING DOWN THE HOST CELL WALL

The PK Snf1 in *S. cerevisiae* triggers the transcriptional response to glucose limitation by inhibiting the carbon catabolite repressor Mig1 and stimulating a set of transcriptional activators. Snf1 is required for growth on less preferred or nonfermentable carbon sources, such as galactose or ethanol, as well as for other functions, such as accumulation of glycogen and filamentation (162). Because the expression of CWDEs and other virulence factors in plant pathogens is often repressed by glucose, a possible regulatory role of Snf1 has been investigated in different plant-pathogenic fungi. Deletion of Snf1 in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* did not affect growth on glucose or sucrose but caused reduced growth on galactose and xylose and growth impairment on arabinose and complex carbon sources, such as xylan, pectin, and purified maize cell walls (140). Importantly, *snf1* mutants showed decreased expression of genes that encode CWDEs such as xylanases, polygalacturonases, and β -1,3-glucanases, and these mutants were attenuated in virulence on corn. Deletion of Snf1 in *F. oxysporum*, *M. oryzae*, and *F. graminearum* also caused reduced expression of CWDE genes, poor growth on nonfermentable or complex carbon sources, and a decrease in host plant colonization and disease symptoms (66, 106, 160). A *F. graminearum* mutant lacking Sak1, the major Snf1-activating PK, had a similar virulence defect as the *snf1*

mutant (147). However, Snf1 was dispensable for virulence in the biotrophic pathogen *U. maydis*, suggesting that CWDEs may only play a minor role in biotrophic plant-pathogen interactions (98). In some fungi, Snf1 is required for proper sexual and asexual development, suggesting that it has additional functions beyond carbon source utilization (66, 160). Thus, although a major role of Snf1 during plant infection involves degradation of plant cell wall polymers and metabolism of the sugars released, its additional functions in virulence are still to be discovered.

CELL CYCLE-REGULATING KINASES: CONTROL OF INFECTION-RELATED MORPHOGENESIS

Cell cycle regulation is instrumental for morphogenetic changes during fungal development and infection. Cell cycle-regulating PKs have been examined in detail in two phylogenetically and biologically distant pathogens, *M. oryzae* and *U. maydis*. Appressorium-mediated host penetration by *M. oryzae* involves three distinct cell cycle checkpoints (130). The first is entry into S-phase, which is critical for the initiation of appressorium morphogenesis, as shown by conditional mutation of Nim1, the regulatory subunit of the Cdc7 kinase complex. Interestingly, a similar phenotype is observed in *kss1* mutants, indicating that the S-phase checkpoint might be under control of this MAPK. The second and third control checkpoints are represented by the entry and the completion of mitosis, respectively. Induction of G2 arrest by mutation of the NIMA (never in mitosis gene A) kinase blocks appressorium maturation, whereas inhibition of mitotic exit by conditional inactivation of the blocked-in-mitosis gene or by expression of stabilized cyclin B prevents penetration peg formation and invasion of the plant tissue (130).

In *U. maydis*, regulation of cell cycle progression is triggered by intra- and extracellular cues and is fundamental for infection of the plant host. Appressorium formation is preceded by an infectious filament that consists of a highly polarized, G2-arrested dikaryotic hypha (90). G2-M transition is controlled by a protein complex composed of the mitotic cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) and the cyclin Clb2 (37). G2 arrest requires inhibitory phosphorylation of Cdk1. This is achieved through cytoplasmic sequestration of the phosphatase Cdc25 by the 14-3-3 protein Bmh1 (**Figure 1**), a process that requires the DNA damage response kinases Atr1 and Chk (28, 90). Consequently, *atr1* and *chk1* mutants fail to arrest in G2 and are defective in virulence (28). In addition, an ortholog of the cyclin-dependent kinase Cdk5/Pho85 regulates the small GTPase Rac1 through localization of its activator Cdc24, and this process is required for polar cell growth, formation of infectious structures, and virulence (13). In *B. cinerea*, deletion of Rac1 caused multiple phenotypes, including a defect in cell cycle progression through mitosis as well as loss of polarity and virulence. However, strains expressing DA Rac1 showed multinucleated hyphae, mislocalization of actin, and a delay in disease progression (91). A recent functional analysis of the *F. graminearum* kinome provided further evidence for an intimate link between cell cycle, polarity, and infectious growth because deletion of different PKs linked to cell cycle control resulted in a significant decrease in virulence on wheat spikelets (147). These PKs include Swe1, which regulates the G2-M transition by inhibiting Cdc28 kinase; Cak1, which phosphorylates Cdk1, thereby promoting its affinity for cyclins; one of the two *F. graminearum* Cdk1 orthologs; the catalytic casein kinase 2 subunit CKA1; and Cdk8, Cdc15, and Dbf2, which regulate mitotic entry and exit. In contrast to *U. maydis*, the two DNA damage response kinases Rad53 and Chk1 are not required for pathogenicity in *F. graminearum*, whereas their upstream regulator, the PK Mec1 was required for efficient plant colonization. This suggests either a direct role of Mec1 in inactivation of Cdc25 or the presence of a third unknown Mec1 effector kinase in ascomycetes (147). When considered together, these findings point to a broadly conserved role of cell cycle control in the morphogenesis of infection structures and fungal pathogenicity on plants.

Phosphatidylinositol lipids (PtdIns):

phospholipid components of cell membranes

PtdIns(4)P:

phosphatidylinositol 4-phosphate

PtdIns(4,5)P₂:

phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate

CELL POLARITY KINASES: SHAPING THE CYTOSKELETON

Polar growth is a fundamental process in fungi (46). During plant infection, but also during asexual and sexual development, fungal pathogens must repeatedly switch between polar and isotropic growth. Reorganization of cell polarity is crucial for plant cell invasion, the production of specialized penetration structures, and the spread of the fungi through the host tissues and compartments. Polarity is regulated by both extracellular and intracellular cues that are directionally conveyed through a complex molecular network that involves extensive reprogramming of protein phosphorylation.

Phosphoinositide-Regulated Protein Kinases

In *S. cerevisiae*, phosphatidylinositol lipids (PtdIns) are phosphorylated at discrete sites of the plasma membrane by the phosphatidylinositol phosphate kinases (PIPKs) Stt4 and Mss4, generating phosphatidylinositol 4-phosphate [PtdIns(4)P] and phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate [PtdIns(4,5)P₂], respectively (129). Phosphorylated PtdIns are bound by effector proteins, such as GTPases and PKs, which promote the assembly and activation of signaling scaffolds, cytoskeleton reorganization, and subcellular partitioning through septin GTPases (40). Phosphorylation of PtdIns is triggered by external stimuli, such as pheromones or unknown host cues, that control a variety of outputs, including vesicle trafficking, cell cycle regulation, polar growth, and morphogenesis (25, 38, 44, 144).

In *M. oryzae*, four PtdIns(4,5)P₂-interacting septins were recently shown to polymerize into a dynamic, hetero-oligomeric ring that scaffolds F-actin filaments at the appressorium pore (25). Proper organization of the septin network depends on the GTPase Cdc42, the PAK Cla4, and the MAPK Slt2. The septin ring creates a diffusion barrier to localize key effector proteins at the point of penetration, thereby providing the cortical rigidity and membrane curvature necessary for the penetration peg to breach the rice leaf surface (25).

In nonappressorium-forming plant pathogens, cell polarity is also crucial for pathogenicity. In *F. graminearum*, deletion of the acidotropic casein kinase 1, which regulates cell morphogenesis, septin assembly, and endocytic trafficking via the production of PtdIns(4,5)P₂, strongly affects virulence (147, 149).

The PK Pkh is a major downstream target of PtdIns that functions as a master regulator of polarity by phosphorylating multiple AGC kinases, including PKA, Pkc1, Ypk1/2, and Sch9 (**Figure 1**) (122, 146). Pkh and TORC2 coregulate the activity of membrane-localized Ypk, which is bound to PtdIns through the pleckstrin homology domain adaptor protein Slm1 (102). Pkh and Ypk are present in phytopathogens, but their cellular functions are largely unknown (23, 29, 147). Recently, a Pkh kinase in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* was shown to function in resistance to cell wall, temperature, and osmotic stress as well as in virulence on mice (15). The only Ypk ortholog examined so far in a plant pathogen is Aga1 from *U. maydis*, whose deletion increased sensitivity to cell wall, temperature, and osmotic stress similar to the *pkh* mutant in *C. neoformans*. In addition, the *U. maydis ypk* mutant was defective in actin-dependent endocytosis, actin organization, appressorium formation, and virulence (6).

There is growing evidence for a link between PtdIns signaling and MAPK pathways in polar growth and virulence. The PIPKs Stt4 and Mss4, as well as the PKs Pkh and Ypk, all contribute to MAPK-regulated functions, such as polarity establishment and cell wall and osmotic stress response (6, 15, 25, 44, 72). It remains to be determined whether PtdIns and the Pkh-Ypk pathway are activated directly or indirectly by MAPK signaling components and whether PtdIns participate in the recruitment of components from the Slt2 and Hog1 MAPK cascades.

Actin-Regulating Protein Kinases

Actin-associated proteins play an important role in endocytosis, a process that is crucial in fungi for polarity establishment, hyphal growth, and virulence (50). In *S. cerevisiae*, the family of actin-regulating kinases is composed of Ark1, Prk1, and Akl1 (136). In *M. oryzae*, Ark1 colocalizes with actin at the periphery of nascent appressoria, whereas in mature appressoria it resides in globular structures at the emergence site of the penetration peg (148). This pattern parallels that of other actin-associated proteins, such as septins, amphiphysin, and Las17 (25), which cooperate with Ark1-Prk1 kinases in early steps of endocytosis (136). *M. oryzae* Ark1 regulates endocytosis and is required for conidiogenesis, oxidative stress response, and virulence (148). Likewise, in *U. maydis* misregulation of actin organization and actin-dependent endocytosis by latrunculin A or deletion of the Ypk PK abolished appressorium formation and plant infection (6). Taken together, these findings point to a key role for actin-regulating kinases and the actin-based network in appressorium-forming plant pathogens, such as *M. oryzae* and *U. maydis*. However, this class of PKs might be less crucial in plant pathogens that have evolved other penetration strategies because the single ortholog of Ark1, Prk1, and Akl1 was recently shown to be dispensable for virulence in *F. graminearum* (147).

Cot1 and the Nuclear Dbf2-Related Kinase Complex

The *cot1* gene was originally discovered in *N. crassa* as a mutation conferring hyperbranching and severely restricted colony growth. It encodes a nuclear Dbf2-related (NDR) PK with a central role in cell polarity and hyphal elongation (159). Cot1 is widely conserved in plant-pathogenic fungi. Mutation of the *cot1* ortholog has been carried out in *U. maydis*, resulting in a phenotype of highly pigmented, chlamyospore-like cells that were unable to generate mating filaments or cause disease on corn plants (34).

A recent study in *N. crassa* indicates that Cot1 forms a NDR kinase complex with the germinal center (GC) PK Pod6 and the scaffold protein Hym1 (30). In line with this finding, *F. graminearum* mutants lacking either Cot1 or Pod6 exhibit the same growth defects (147). Along with its function in the NDR kinase complex, Hym1 also acts as a scaffold and regulator of the Kss1 MAPK cascade, suggesting that it may coordinate the two signaling pathways to regulate tropic hyphal growth and cell polarity (30).

NEW INSIGHTS FROM FUNCTIONAL KINOME ANALYSIS

Although an increasing number of PKs have been linked with fungal pathogenicity, many others still remain to be discovered. An important step toward this goal has been the first functional characterization of the complete predicted kinome in a plant pathogen, the wheat scab fungus *F. graminearum* (147). Twenty of the 116 predicted PK genes appeared to be essential, and systematic deletion was performed for the remaining 96 PK genes. Phenotypic characterization led to the identification of 42 PK mutants that were either nonpathogenic or significantly reduced in virulence on wheat spikes (147).

Examples of PKs with a key role in virulence whose orthologs have been functionally characterized in *S. cerevisiae* are Sky1, a serine-arginine-rich (SR) PK that regulates low-affinity polyamine uptake and ion homeostasis; Gsk3, a glycogen synthase PK involved in calcineurin signaling, stress response, mitosis, and meiosis; Yak1, a dual-specificity Tyr phosphorylation-regulated kinase (DYRK) that is a direct target of PKA and functions as a growth antagonist; Kin82, a PK that regulates the function of aminophospholipid flippases; Kic1, a component of the regulation of Ace2 and morphogenesis (RAM) pathway; Sid1, a PK functioning in the septation initiation network; Pom1,

a PK that triggers mitotic commitment; and Prp4, a spliceosome-associated PK (147). Two additional PKs that are unique to filamentous fungi, Fg03146 and Fg04770, were dispensable for hyphal growth but required for plant infection (147). More detailed studies are needed to gain a deeper understanding on the function of these new virulence-related fungal PKs during plant infection.

CONCLUDING REMARKS AND FUTURE ISSUES

Pathogenicity is a complex phenotype involving a wide array of cellular processes. Substantial progress has been made in identifying the principal PKs that govern fungal infection on plants, although important gaps remain even in the best-studied signaling pathways. One emerging theme from these studies is that PK cascades form molecular assemblies whose spatial organization is ensured by scaffolding proteins. Compartmentalization by scaffolds prevents undesirable leakage of the signal into competing pathways while still allowing cross talk among different signaling modules (126). Understanding how signal integration between PK cascades is accomplished will be a major challenge for future studies. As the complexity of these pathways is becoming ever more apparent (147), the development of more sophisticated molecular and analytical tools similar to those available in *S. cerevisiae* will be a priority in the model pathogen species. This will allow the establishment of quantitative dynamic models that predict the behavior of PK circuits under a variety of environmental conditions.

Another rich area for future studies is the elucidation of the elusive host-derived signals that function upstream of PK modules. Understanding how these stimuli are sensed by the fungal cell to elicit infectious growth will be a formidable task, given the complexity of fungus-plant interactions. This will most likely require an interdisciplinary effort that combines molecular, chemical, and structural approaches.

The high degree of conservation of PKs among plant pathogens makes this class of proteins an attractive target for the control of fungal infections. In a recent study, the X-ray structure of *U. maydis* GSK3 was used as a basis to design strategies for its selective inhibition by type-II kinase inhibitors (43). However, in planta-induced transient gene silencing (PITGS) was applied to selectively target the transcripts of the Kss1 MAPK-encoding gene of the wheat pathogen *Puccinia triticina*. Transformation-mediated delivery of hairpin silencing constructs into wheat leaves produced gene-specific siRNA molecules, which resulted in a 70% reduction of fungal target gene transcript levels, inhibited fungal growth in planta, and suppressed rust disease caused by different *Puccinia* species (107).

In summary, the wide variety of fungal PKs and their diverse functions during plant infection represents a fascinating field for future studies. This will likely reveal a much more complex relationship between fungal pathogens, their hosts, and the environment than is currently appreciated. Among this complexity, conserved patterns of signal sensing and amplification will continue to emerge.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding, or financial holdings that might be perceived as affecting the objectivity of this review.

ACKNOWLEDGMENTS

We apologize to the colleagues whose work could not be cited because of space restrictions. A.D.P. is supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the European FP7 (Marie Curie Actions).

LITERATURE CITED

1. Alex LA, Borkovich KA, Simon MI. 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3416–21
2. Alex LA, Korch C, Selitrennikoff CP, Simon MI. 1998. COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7069–73
3. Andrews DL, Egan JD, Mayorga ME, Gold SE. 2000. The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:781–86
4. Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. 2006. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* 17:3122–35
5. Banuett F, Herskowitz I. 1994. Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev.* 8:1367–78
6. Berndt P, Lanver D, Kahmann R. 2010. The AGC Ser/Thr kinase *Aga1* is essential for appressorium formation and maintenance of the actin cytoskeleton in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 78:1484–99
7. Bluhm BH, Zhao X, Flaherty JE, Xu JR, Dunkle LD. 2007. RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:627–36
8. Boyce KJ, Andrianopoulos A. 2011. Ste20-related kinases: effectors of signaling and morphogenesis in fungi. *Trends Microbiol.* 19:400–10
9. Brachmann A, Schirawski J, Muller P, Kahmann R. 2003. An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 22:2199–210
10. Bruno KS, Tenjo F, Li L, Hamer JE, Xu JR. 2004. Cellular localization and role of kinase activity of PMK1 in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot. Cell* 3:1525–32
11. Buck V, Quinn J, Soto Pino T, Martin H, Saldanha J, et al. 2001. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Biol. Cell* 12:407–19
12. Carbo N, Perez-Martin J. 2010. Activation of the cell wall integrity pathway promotes escape from G2 in the fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Genet.* 6:e1001009
13. Castillo-Lluva S, Alvarez-Tabares I, Weber I, Steinberg G, Perez-Martin J. 2007. Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J. Cell Sci.* 120:1584–95
14. Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell* 2:1151–61
15. Chabrier-Rosello Y, Gerik KJ, Koselny K, DiDone L, Lodge JK, Krysan DJ. 2013. *Cryptococcus neoformans* phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) ortholog is required for stress tolerance and survival in murine phagocytes. *Eukaryot. Cell* 12:12–22
16. Chen C, Dickman MB. 2004. Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol. Microbiol.* 51:1493–507
17. Chen C, Dickman MB. 2005. cAMP blocks MAPK activation and sclerotial development via Rap-1 in a PKA-independent manner in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Microbiol.* 55:299–311
18. Chen J, Zheng W, Zheng S, Zhang D, Sang W, et al. 2008. Rac1 is required for pathogenicity and Chm1-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *PLoS Pathog.* 4:e1000202
19. Chen LH, Lin CH, Chung KR. 2012. Roles for SKN7 response regulator in stress resistance, conidiation and virulence in the citrus pathogen *Alternaria alternata*. *Fungal Genet. Biol.* 49:802–13
20. Cho Y, Kim KH, La Rota M, Scott D, Santopietro G, et al. 2009. Identification of novel virulence factors associated with signal transduction pathways in *Alternaria brassicicola*. *Mol. Microbiol.* 72:1316–33
21. Choi W, Dean RA. 1997. The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* 9:1973–83
22. Cohen P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation: a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25:596–601

23. Colabardini AC, Brown NA, Savoldi M, Goldman MH, Goldman GH. 2013. Functional characterization of *Aspergillus nidulans ypkA*, a homologue of the mammalian kinase SGK. *PLoS ONE* 8:e57630
24. Cui W, Beever RE, Parkes SL, Weeds PL, Templeton MD. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genet. Biol.* 36:187–98
25. Dagdas YF, Yoshino K, Dagdas G, Ryder LS, Bielska E, et al. 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* 336:1590–95
26. Davidson RC, Nichols CB, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. 2003. A MAP kinase cascade composed of cell type specific and non-specific elements controls mating and differentiation of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 49:469–85
27. Deng F, Allen TD, Nuss DL. 2007. Ste12 transcription factor homologue CpST12 is down-regulated by hypovirus infection and required for virulence and female fertility of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryot. Cell* 6:235–44
28. de Sena-Tomas C, Fernandez-Alvarez A, Holloman WK, Perez-Martin J. 2011. The DNA damage response signaling cascade regulates proliferation of the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* in planta. *Plant Cell* 23:1654–65
29. De Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, Andrews P, Ringelberg CS, et al. 2013. Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS ONE* 8:e58008
30. Dettmann A, Illgen J, Marz S, Schurg T, Fleissner A, Seiler S. 2012. The NDR kinase scaffold HYM1/MO25 is essential for MAK2 map kinase signaling in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet.* 8:e1002950
31. Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Meglecz E, Roncero MI. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39:1140–52
32. Dixon KP, Xu JR, Smirnov N, Talbot NJ. 1999. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 11:2045–58
33. Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. 2006. Different signalling pathways involving a G α protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol. Microbiol.* 59:821–35
34. Durrenberger F, Kronstad J. 1999. The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 261:281–89
35. Durrenberger F, Wong K, Kronstad JW. 1998. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5684–89
36. Egan MJ, Wang ZY, Jones MA, Smirnov N, Talbot NJ. 2007. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:11772–77
37. Garcia-Muse T, Steinberg G, Perez-Martin J. 2004. Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J. Cell Sci.* 117:487–506
38. Garrenton LS, Stefan CJ, McMurray MA, Emr SD, Thorner J. 2010. Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:11805–10
39. Garrido E, Voss U, Muller P, Castillo-Lluva S, Kahmann R, Perez-Martin J. 2004. The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. *Genes Dev.* 18:3117–30
40. Gladfelter AS. 2010. Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:720–26
41. Gold S, Duncan G, Barrett K, Kronstad J. 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* 8:2805–16
42. Gold SE, Brogdon SM, Mayorga ME, Kronstad JW. 1997. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* 9:1585–94
43. Grutter C, Simard JR, Mayer-Wrangowski SC, Schreier PH, Perez-Martin J, et al. 2012. Targeting GSK3 from *Ustilago maydis*: type-II kinase inhibitors as potential antifungals. *ACS Chem. Biol.* 7:1257–67
44. Guillas I, Vernay A, Vitagliano JJ, Arkowitz RA. 2013. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is required for invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 126:3602–14

45. Hamel LP, Nicole MC, Duplessis S, Ellis BE. 2012. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* 24:1327–51
46. Harris SD, Momany M. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet. Biol.* 41:391–400
47. Hartmann HA, Kahmann R, Bolker M. 1996. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 15:1632–41
48. Heller J, Ruhnke N, Espino JJ, Massaroli M, Collado IG, Tudzynski P. 2012. The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:802–16
49. Heller J, Tudzynski P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:369–90
50. Higuchi Y, Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K. 2009. Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* 8:37–46
51. Hou Z, Xue C, Peng Y, Katan T, Kistler HC, Xu JR. 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1119–27
52. Igbaria A, Lev S, Rose MS, Lee BN, Hadar R, et al. 2008. Distinct and combined roles of the MAP kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in virulence and stress responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:769–80
53. Izumitsu K, Yoshimi A, Kubo D, Morita A, Saitoh Y, Tanaka C. 2009. The MAPKK kinase ChSte11 regulates sexual/asexual development, melanization, pathogenicity, and adaptation to oxidative stress in *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* 55:439–48
54. Jacinto E, Hall MN. 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:117–26
55. Jenczmionka NJ, Maier FJ, Losch AP, Schafer W. 2003. Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Curr. Genet.* 43:87–95
56. Jenczmionka NJ, Schafer W. 2005. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Curr. Genet.* 47:29–36
57. Jeon J, Goh J, Yoo S, Chi MH, Choi J, et al. 2008. A putative MAP kinase kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:525–34
58. Joubert A, Bataille-Simoneau N, Champion C, Guillemette T, Hudhomme P, et al. 2011. Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cell Microbiol.* 13:62–80
59. Kaffarnik F, Muller P, Leibundgut M, Kahmann R, Feldbrugge M. 2003. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 22:5817–26
60. Kershaw MJ, Talbot NJ. 2009. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:15967–72
61. Kojima K, Kikuchi T, Takano Y, Oshiro E, Okuno T. 2002. The mitogen-activated protein kinase gene *MAF1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1268–76
62. Kruger J, Loubradou G, Regenfelder E, Hartmann A, Kahmann R. 1998. Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 260:193–98
63. Kruger J, Loubradou G, Wanner G, Regenfelder E, Feldbrugge M, Kahmann R. 2000. Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1034–40
64. Lanver D, Mendoza-Mendoza A, Brachmann A, Kahmann R. 2010. Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22:2085–101
65. Lee N, Kronstad JW. 2002. ras2 controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* 1:954–66
66. Lee SH, Lee J, Lee S, Park EH, Kim KW, et al. 2009. GzSNF1 is required for normal sexual and asexual development in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* 8:116–27
67. Lee YH, Dean RA. 1993. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:693–700

68. Lev S, Horwitz BA. 2003. A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. *Plant Cell* 15:835–44
69. Lev S, Sharon A, Hadar R, Ma H, Horwitz BA. 1999. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13542–47
70. Lev S, Tal H, Rose MS, Horwitz BA. 2009. Signaling by the pathogenicity-related MAP kinase of *Cochliobolus heterostrophus* correlates with its local accumulation rather than phosphorylation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1093–103
71. Leveleki L, Mahlert M, Sandrock B, Bolker M. 2004. The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 54:396–406
72. Levin DE. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:262–91
73. Li D, Agrellos OA, Calderone R. 2010. Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:424–30
74. Li G, Zhou X, Xu JR. 2012. Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 15:678–84
75. Li L, Xue C, Bruno K, Nishimura M, Xu JR. 2004. Two PAK kinase genes, *CHM1* and *MST20*, have distinct functions in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:547–56
76. Lin CH, Chung KR. 2010. Specialized and shared functions of the histidine kinase- and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. *Fungal Genet. Biol.* 47:818–27
77. Liu H, Styles CA, Fink GR. 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* 262:1741–44
78. Liu H, Suresh A, Willard FS, Siderovski DP, Lu S, Naqvi NI. 2007. Rgs1 regulates multiple G α subunits in *Magnaporthe* pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. *EMBO J.* 26:690–700
79. Liu S, Dean RA. 1997. G protein α subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:1075–86
80. Liu W, Zhou X, Li G, Li L, Kong L, et al. 2011. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathog.* 7:e1001261
81. Lopez-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, 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* 22:2459–75
82. Mahlert M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B, Bolker M. 2006. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 59:567–78
83. Malagnac F, Lalucque H, Lepere G, Silar P. 2004. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 41:982–97
84. Mayorga ME, Gold SE. 1999. A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* 34:485–97
85. Mehrabi R, Ding S, Xu JR. 2008. MADS-box transcription factor mig1 is required for infectious growth in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot. Cell* 7:791–99
86. Mehrabi R, Kema GH. 2006. Protein kinase A subunits of the ascomycete pathogen *Mycosphaerella graminicola* regulate asexual fructification, filamentation, melanization and osmosensing. *Mol. Plant Pathol.* 7:565–77
87. Mehrabi R, Van der Lee T, Waalwijk C, Gert HJ. 2006. *MgSlr2*, a cellular integrity MAP kinase gene of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is dispensable for penetration but essential for invasive growth. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:389–98
88. Mey G, Held K, Scheffer J, Tenberge KB, Tudzynski P. 2002. CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 46:305–18

89. Mey G, Oeser B, Lebrun MH, Tudzynski P. 2002. The biotrophic, non-appressorium-forming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a Fus3/Pmk1 homologous mitogen-activated protein kinase for colonization of rye ovarian tissue. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:303–12
90. Mielnichuk N, Sgarlata C, Perez-Martin J. 2009. A role for the DNA-damage checkpoint kinase Chk1 in the virulence program of the fungus *Ustilago maydis*. *J. Cell Sci.* 122:4130–40
91. Minz Dub A, Kokkelink L, Tudzynski B, Tudzynski P, Sharon A. 2013. Involvement of *Botrytis cinerea* small GTPases BcRAS1 and BcRAC in differentiation, virulence, and the cell cycle. *Eukaryot. Cell* 12:1609–18
92. Mitchell TK, Dean RA. 1995. The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 7:1869–78
93. Mosch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH. 1999. Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10:1325–35
94. Mosch HU, Roberts RL, Fink GR. 1996. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5352–56
95. Motoyama T, Kadokura K, Ohira T, Ichiishi A, Fujimura M, et al. 2005. A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet. Biol.* 42:200–12
96. Muller P, Aichinger C, Feldbrugge M, Kahmann R. 1999. The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 34:1007–17
97. Muller P, Weinzierl G, Brachmann A, Feldbrugge M, Kahmann R. 2003. Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot. Cell* 2:1187–99
98. Nadal M, Garcia-Pedrajas MD, Gold SE. 2010. The *snf1* gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes. *Phytopathology* 100:1364–72
99. Nathues E, Jorgens C, Lorenz N, Tudzynski P. 2007. The histidine kinase CpHK2 has impact on spore germination, oxidative stress and fungicide resistance, and virulence of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Pathol.* 8:653–65
100. Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* 48:1124–29
101. Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312:583–88
102. Niles BJ, Mogri H, Hill A, Vlahakis A, Powers T. 2012. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109:1536–41
103. Nishimura M, Park G, Xu JR. 2003. The G-β subunit MGB1 is involved in regulating multiple steps of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Microbiol.* 50:231–43
104. Oide S, Liu J, Yun SH, Wu D, Michev A, et al. 2010. Histidine kinase two-component response regulator proteins regulate reproductive development, virulence, and stress responses of the fungal cereal pathogens *Cochliobolus heterostrophus* and *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* 9:1867–80
105. Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, et al. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* 72:1760–66
106. Ospina-Giraldo MD, Mullins E, Kang S. 2003. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Curr. Genet.* 44:49–57
107. Panwar V, McCallum B, Bakkeren G. 2013. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to the suppression of rust diseases on wheat. *Plant J.* 73:521–32

108. Park G, Bruno KS, Staiger CJ, Talbot NJ, Xu JR. 2004. Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. *Mol. Microbiol.* 53:1695–707
109. Park G, Xue C, Zhao X, Kim Y, Orbach M, Xu JR. 2006. Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 18:2822–35
110. Park G, Xue C, Zheng L, Lam S, Xu JR. 2002. MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:183–92
111. Park SM, Choi ES, Kim MJ, Cha BJ, Yang MS, Kim DH. 2004. Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. *Mol. Microbiol.* 51:1267–77
112. Perez-Nadales E, Di Pietro A. 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 23:1171–85
113. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* 86:865–75
114. Prados Rosales RC, Di Pietro A. 2008. Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* 7:162–71
115. Qi Z, Wang Q, Dou X, Wang W, Zhao Q, et al. 2012. MoSwi6, an APSES family transcription factor, interacts with MoMps1 and is required for hyphal and conidial morphogenesis, appressorial function and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 13:677–89
116. Ramamoorthy V, Zhao X, Snyder AK, Xu JR, Shah DM. 2007. Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cell Microbiol.* 9:1491–506
117. Ramanujam R, Naqvi NI. 2010. PdeH, a high-affinity cAMP phosphodiesterase, is a key regulator of asexual and pathogenic differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 6:e1000897
118. Rispaïl N, Di Pietro A. 2009. *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:830–39
119. Rispaïl N, Di Pietro A. 2010. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 11:395–407
120. Rispaïl N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grunler A, et al. 2009. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calciueurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 46:287–98
121. Robertson LS, Fink GR. 1998. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13783–87
122. Roelants FM, Torrance PD, Bezman N, Thorner J. 2002. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol. Biol. Cell* 13:3005–28
123. Rolke Y, Tudzynski P. 2008. The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 68:405–23
124. Rui O, Hahn M. 2007. The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Mol. Plant Pathol.* 8:173–84
125. Ruiz-Roldan MC, Maier FJ, Schafer W. 2001. PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:116–25
126. Saito H. 2010. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:677–83
127. Saito H, Posas F. 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192:289–318
128. Salamon JA, Acuña R, Dawe AL. 2010. Phosphorylation of phosducin-like protein BDM-1 by protein kinase 2 (CK2) is required for virulence and G β subunit stability in the fungal plant pathogen *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Microbiol.* 76:848–60
129. Santarius M, Lee CH, Anderson RA. 2006. Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P2 pools. *Biochem. J.* 398:1–13

130. Saunders DG, Aves SJ, Talbot NJ. 2010. Cell cycle-mediated regulation of plant infection by the rice blast fungus. *Plant Cell* 22:497–507
131. Schamber A, Leroch M, Diwo J, Mendgen K, Hahn M. 2010. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 11:105–19
132. Schumacher J, Kokkelink L, Huesmann C, Jimenez-Teja D, Collado IG, et al. 2008. The cAMP-dependent signaling pathway and its role in conidial germination, growth, and virulence of the gray mold *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1443–59
133. Segmuller N, Ellendorf U, Tudzynski B, Tudzynski P. 2007. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* 6:211–21
134. Shim WB, Dunkle LD. 2003. CZK3, a MAP kinase kinase kinase homolog in *Cercospora zea-maydis*, regulates cercosporin biosynthesis, fungal development, and pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:760–68
135. Smith DG, Garcia-Pedrajas MD, Hong W, Yu Z, Gold SE, Perlin MH. 2004. An *ste20* homologue in *Ustilago maydis* plays a role in mating and pathogenicity. *Eukaryot. Cell* 3:180–89
136. Smythe E, Ayscough KR. 2003. The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton. *EMBO Rep.* 4:246–51
137. Stichernoth C, Fraund A, Setiadi E, Giasson L, Vecchiarelli A, Ernst JF. 2011. Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 10:502–11
138. Takano Y, Kikuchi T, Kubo Y, Hamer JE, Mise K, Furusawa I. 2000. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:374–83
139. Tong X, Zhang X, Plummer KM, Stowell KM, Sullivan PA, Farley PC. 2007. GcSTUA, an APSES transcription factor, is required for generation of appressorial turgor pressure and full pathogenicity of *Glomerella cingulata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1102–11
140. Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD. 2000. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 12:237–48
141. Tsuji G, Fujii S, Tsuge S, Shiraishi T, Kubo Y. 2003. The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:315–25
142. Tzima A, Paplomatas EJ, Rauyaree P, Kang S. 2010. Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet. Biol.* 47:406–15
143. Van Thuat N, Schafer W, Bormann J. 2012. The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:1142–56
144. Vernay A, Schaub S, Guillas I, Bassilana M, Arkowitz RA. 2012. A steep phosphoinositide bis-phosphate gradient forms during fungal filamentous growth. *J. Cell Biol.* 198:711–30
145. Viaud M, Fillinger S, Liu W, Polepalli JS, Le Pecheur P, et al. 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1042–50
146. Voordeckers K, Kimpe M, Haesendonckx S, Louwet W, Versele M, Thevelein JM. 2011. Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1–3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *J. Biol. Chem.* 286:22017–27
147. Wang C, Zhang S, Hou R, Zhao Z, Zheng Q, et al. 2011. Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Patbog.* 7:e1002460
148. Wang J, Du Y, Zhang H, Zhou C, Qi Z, et al. 2013. The actin-regulating kinase homologue MoArk1 plays a pleiotropic function in *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 14:470–82
149. Wang Y, Liu TB, Patel S, Jiang L, Xue C. 2011. The casein kinase I protein Cck1 regulates multiple signaling pathways and is essential for cell integrity and fungal virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 10:1455–64
150. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79:143–80

151. Wong Sak Hoi J, Herbert C, Bacha N, O'Connell R, Lafitte C, et al. 2007. Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol. Microbiol.* 64:68–82
152. Xu JR, Hamer JE. 1996. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* 10:2696–706
153. Xu JR, Staiger CJ, Hamer JE. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12713–18
154. Yamauchi J, Takayanagi N, Komeda K, Takano Y, Okuno T. 2004. cAMP-pKA signaling regulates multiple steps of fungal infection cooperatively with Cmk1 MAP kinase in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1355–65
155. Yan L, Yang Q, Sundin GW, Li H, Ma Z. 2010. The mitogen-activated protein kinase kinase BOS5 is involved in regulating vegetative differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 47:753–60
156. Yan X, Li Y, Yue X, Wang C, Que Y, et al. 2011. Two novel transcriptional regulators are essential for infection-related morphogenesis and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 7:e1002385
157. Yang Q, Yan L, Gu Q, Ma Z. 2012. The mitogen-activated protein kinase kinase kinase BcOs4 is required for vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:481–92
158. Yang Z, Dickman MB. 1999. *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:430–39
159. Yarden O, Plamann M, Ebbole DJ, Yanofsky C. 1992. *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *EMBO J.* 11:2159–66
160. Yi M, Park JH, Ahn JH, Lee YH. 2008. MoSNF1 regulates sporulation and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 45:1172–81
161. Yoshimi A, Tsuda M, Tanaka C. 2004. Cloning and characterization of the histidine kinase gene *Dic1* from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Mol. Genet. Genomics* 271:228–36
162. Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR. 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42:27–81
163. Zhang H, Liu K, Zhang X, Song W, Zhao Q, et al. 2010. A two-component histidine kinase, MoSLN1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Curr. Genet.* 56:517–28
164. Zhang H, Xue C, Kong L, Li G, Xu JR. 2011. A Pmk1-interacting gene is involved in appressorium differentiation and plant infection in *Magnaporthe oryzae*. *Eukaryot. Cell* 10:1062–70
165. Zhao X, Kim Y, Park G, Xu JR. 2005. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 17:1317–29
166. Zhao X, Mehrabi R, Xu JR. 2007. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryot. Cell* 6:1701–14
167. Zhao X, Xu JR. 2007. A highly conserved MAPK-docking site in Mst7 is essential for Pmk1 activation in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Microbiol.* 63:881–94
168. Zheng L, Campbell M, Murphy J, Lam S, Xu JR. 2000. The *BMPI* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:724–32
169. Zhou X, Liu W, Wang C, Xu Q, Wang Y, et al. 2011. A MADS-box transcription factor MoMcm1 is required for male fertility, microconidium production and virulence in *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Microbiol.* 80:33–53
170. Zhou X, Zhang H, Li G, Shaw B, Xu JR. 2012. The cyclase-associated protein Cap1 is important for proper regulation of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 8:e1002911