



Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias



IHSM-UMA-CSIC

Análisis morfológico y funcional de la interacción *Podosphaera xanthii*-cucurbitáceas

TESIS DOCTORAL
JESÚS MARTÍNEZ CRUZ


Málaga, 2016



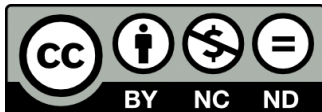


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Jesús Martínez Cruz

 <http://orcid.org/0000-0002-3632-0837>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





*Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias*



IHSM-UMA-CSIC

Análisis morfológico y funcional de la interacción *Podosphaera xanthii*-cucurbitáceas

Memoria presentada por

Jesús Martínez Cruz

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias*

D. Juan JOSÉ BORREGO GARCÍA, Director del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Análisis morfológico y funcional de la interacción *Podospaera xanthii*-cucurbitáceas” del doctorando **D. JESÚS MARTÍNEZ CRUZ** para optar al grado de Doctor en Biología, por el Departamento de Microbiología de esta Universidad.

Y para que así conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, expedimos el presente informe.

En Málaga, 12 de Julio de 2016

Fdo. D. Juan José Borrego García



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias*



IHSM-UMA-CSIC

D. ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, en la Universidad de Málaga.

D. DIEGO FRANCISCO ROMERO HINOJOSA, Investigador Científico del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, en la Universidad de Málaga.

INFORMAN:

Que **D. JESÚS MARTÍNEZ CRUZ**, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, expedimos el presente informe.

En Málaga, a 12 de Julio de 2016

Fdo. D. Alejandro Pérez García

Fdo. D. Diego Fco. Romero Hinojosa



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias*



IHSM-UMA-CSIC

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos:

APROXIMACIONES GENOMICAS PARA EL CONTROL RACIONAL DEL OIDIO DE LAS CUCURBITACEAS (POSDOSPHAERA FUSCA). Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (Plan Nacional de I+D+I) (AGL 2010-21848-CO2-01). Investigador Principal: Dr. Alejandro Pérez García

EXPLOTACIÓN DE LA GENOMICA PARA EL CONTROL DEL OIDIO DE LAS CUCURBITACEAS. Ministerio de Economía y Competitividad, Programa Estatal de I+D+i orientada a los Retos de la Sociedad (AGL2013-41939-R). Investigador principal: Dr. Alejandro Pérez García.

Jesús Martínez Cruz disfrutó de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad de referencia BES-2011-046757 asociada al proyecto de investigación AGL 2010-21848-CO2-01.



RESUMEN

Los oídios son probablemente la más común, extensa y fácilmente reconocible enfermedad de plantas. Los síntomas de la enfermedad están caracterizados por el aspecto de polvo blanquecino del crecimiento del hongo que se desarrolla en la superficie de la hoja, pecíolos, tallos y raramente en frutos. Los oídios son patógenos biotrofos obligados que crecen en la superficie de los tejidos verdes de su huésped, llegando a ser uno de los grupos de patógenos de plantas más importantes desde el punto de vista económico. El oídio es una de las enfermedades más importantes para los cultivos de cucurbitáceas. Los agentes causantes de la enfermedad en cucurbitáceas son *Golovinomyces cichoracearum* y *Podosphaera xanthii*. En el sur de España, sin embargo, *P. xanthii* (sinónimo *Podosphaera fusca*) ha sido identificado como el único agente causal de la enfermedad, que aunque afecta a todas las especies de cucurbitáceas cultivadas, es especialmente grave para los cultivos de melón (*Cucumis melo* L.), calabacín (*Cucurbita pepo* L.) y calabaza (*Cucurbita maxima* L.) Al igual que otros oídios, *P. xanthii* es un patógeno biotrofo obligado que requiere células vivas de su hospedador para completar su ciclo de vida. Esto es debido al desarrollo de una estructura especializada en el interior de las células de su hospedador denominada haustorio, estableciendo de esta forma una íntima relación con el citoplasma de las células de su hospedador. A pesar de estar localizado en el interior de las células epidérmicas de la planta, el haustorio permanece separado del citoplasma de la planta por una membrana plasmática, denominada membrana extrahaustorial (EHM), cuya diferenciación y/o formación es aún desconocida. La EHM está unida a la membrana plasmática de la planta por una región del cuello denominada septum. Entre la pared celular del haustorio y la EHM se localiza la matriz extrahaustorial (EHMx), en la cual se debe producir el intercambio de

moléculas entre el parásito y su huésped. Dentro de esta matriz se extienden unas proyecciones del cuerpo del haustorio, denominadas lóbulos.

El haustorio es la estructura responsable de la toma de nutrientes y del intercambio de factores con la planta. Entre estos factores se encuentran unas pequeñas proteínas secretadas denominadas efectores. Estas proteínas son responsables de alterar la arquitectura y el metabolismo celular, e interactuar con proteínas de defensa de la planta inhibiendo en algunos casos la HR (reacción de hipersensibilidad) y en otros casos modulando la respuesta de defensa e incluso ocultando al patógeno del reconocimiento de la planta.

En el sur de España y en muchos otros países, *P. xanthii* ha sido identificado como el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas. A pesar de la relevancia de los haustorios en el ciclo de vida de los oídios, poco se sabe acerca de estas estructuras en *P. xanthii*. En esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un análisis estructural y morfológico del haustorio de *P. xanthii* (capítulo 2), primero en el interior de las células epidérmicas de melón con el fin de determinar su estructura y facilitar su aislamiento. Posteriormente, para estudiar en detalle la morfología de los haustorios de *P. xanthii* se llevó a cabo la puesta a punto de un método de aislamiento selectivo de haustorios a partir de cotiledones de calabacín completamente infectados. Mediante técnicas de microscopía confocal (CLSM) observamos la pared celular de los haustorios con una aglutinina de germen de trigo marcada con un fluoróforo, una sonda que se une a los residuos de *N*-acetilglucosamina de la quitina, componente mayoritario de la pared celular de los hongos. De esta manera, se marcaron con fluorescencia diferentes estructuras del haustorio como el cuerpo, lóbulos, cuello y septum, no así EHM y EHMx. Además, se observó que el tamaño y el número de lóbulos alrededor del cuerpo del haustorio aumentaban progresivamente en el tiempo hasta rodearlo completamente, lo que era indicativo de la madurez del mismo. En paralelo, se

realizó un estudio detallado de la ultraestructura del haustorio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) a partir de cortes ultrafinos de hojas de melón densamente infectadas con el hongo, observándose lo parecía ser depósitos de calosa alrededor del complejo del haustorio. Por ello, se llevó a cabo una doble tinción con azul de anilina y calcoflúor para visualizar los depósitos de calosa mediante CLSM. De esta manera, se observó que los depósitos de calosa aumentaban con el tiempo alrededor de los complejos del haustorio, sin impedir el desarrollo del mismo. Recientemente, se ha descrito la presencia de pequeñas vesículas y cuerpos multivesiculares (MVB) en complejos del haustorio de *Golovinomyces orontii* (oídio de *Arabidopsis*). Por ello, hemos creído oportuno realizar una tinción vital de haustorios de *P. xanthii* con un colorante específico de membranas, observándose un patrón diferente en la distribución de pequeñas vesículas, endosomas y MVB, entre lóbulos y cuerpo del haustorio, además, de una alta presencia de vacuolas de gran tamaño en éste último. Nuestros resultados sugieren que los lóbulos serían los máximos responsables del tráfico de vesículas y, probablemente, los principales mediadores del diálogo molecular con la planta.

Analizada la estructura del haustorio de *P. xanthii* y puesto a punto un método de aislamiento selectivo de haustorios, era necesario el desarrollo de un método de transformación de *P. xanthii* para el análisis funcional de sus genes. Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos para la transformación de hongos biotrofos, sin embargo, debido su estilo de vida, estas estrategias de transformación no han dado resultados satisfactorios. Una alternativa ha sido el uso de la planta como vector para la expresión de construcciones que permitan el silenciamiento o la sobreexpresión de los efectores, sin embargo, la localización y el mecanismo de secreción de los mismos siguen siendo aspectos desconocidos.

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue poner a punto un método de transformación genética de *P. xanthii* para, entre otras cosas, realizar

estudios funcional es con los efectores candidatos. Para ello, desarrollamos un método de transformación basado en el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* (capítulo 3). Mediante este método, se obtuvieron transformantes para una variedad de construcciones: i) plásmidos que expresan el gen *egfp* bajo el control de promotores constitutivos o inducibles de *Aspergillus nidulans*, ii) plásmidos que expresan el casete de resistencia a higromicina B o un alelo de β -tubulina de *P. xanthii* que confiere resistencia a fungicidas MBC. Tras la transformación, las colonias transformantes se analizaron mediante microscopía confocal. También se confirmó que las colonias transformantes no presentaban cambios fenotípicos con respecto a las colonias no transformadas del parental, y se confirmó la estabilidad de la modificación genotípica tras sucesivas generaciones en presencia del agente de selección. Además, los análisis moleculares mostraron la presencia del T-DNA en las colonias transformadas de *P. xanthii*. Los análisis de las regiones flanqueantes de los T-DNA insertados se llevaron a cabo mediante TAIL-PCR, demostrándose la integración al azar de los T-DNA en el genoma de *P. xanthii*. No obstante, esta transformación resultó ser inestable ya que la propagación de los transformantes en ausencia de presión de selección ocasionaba la pérdida de los fenotipos de resistencia y fluorescencia, que como se pudo comprobar mediante “Southern blot” era debida a la pérdida del T-DNA.

Uno de los mayores inconvenientes de la transformación de hongos biotrofos obligados obligados y, en especial, de los oídios, es la necesidad de cultivar el microorganismo exclusivamente sobre el hospedador y los daños que puedan ser causados al patógeno, dependiendo del sistema de transformación. Tal y como se ha observado en la transformación directa de esporas de *P. xanthii* mediante *A. tumefaciens*, el factor limitante es la fragilidad de las esporas frente al tiempo de co-incubación en medio líquido con la bacteria. Es por ello que decidimos modificar la técnica para realizar la transformación de *P. xanthii* a través del

órgano natural de toma de nutrientes de los oídios, el haustorio (capítulo 4). En trabajos previos llevados a cabo en *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* se observó que esta especie de oídio era capaz de tomar ARN interferente desde el citoplasma de células de hojas de cebada que lo acumulaban. Basándonos en esta observación, llevamos a cabo la transformación de cotiledones de melón con las construcciones ensayadas en el trabajo de transformación directa de esporas de *P. xanthii*, pPK2-hphgfp y pPK2Tgfp, usando para ello el sistema conocido como “agroinfiltración”. Tras analizar los cotiledones transformados con ambas construcciones observamos que las células de melón no eran capaces de expresar la proteína GFP. Sin embargo, observamos que las colonias de *P. xanthii* que crecían sobre las zonas infiltradas mostraban resistencia frente a higromicina B y carbendazima y además, dichas colonias resistentes mostraban una intensa fluorescencia al ser examinadas mediante microscopia confocal. Es interesante remarcar que las colonias mostraban una distribución irregular de la fluorescencia, consecuencia del sistema de transformación, puesto que no todas las células de la planta son transformadas mediante *A. tumefaciens*.

El análisis de la eficiencia del sistema de transformación en planta a través del haustorio mediante *A. tumefaciens* (IPAMTH, su acrónimo en inglés) mostró casi el doble de transformantes por ensayo en comparación con el sistema de transformación directa de esporas de *P. xanthii* mediante *A. tumefaciens*. A partir de colonias resistentes a higromicina B y carbendazima se llevó a cabo el análisis molecular. El análisis por PCR de las colonias transformantes mostró la presencia de amplicones de los tamaños esperados correspondiente a los diferentes marcadores insertados en el T-DNA. Además, el análisis mediante TAIL-PCR de las regiones flanqueantes del T-DNA de distintos transformantes mostró que el T-DNA se había integrado al azar en el genoma de dichas colonias.

Llegados a este punto y demostrada la robustez y fiabilidad del sistema de transformación IPAMTH, decidimos llevar a cabo la localización en vivo de un efector candidato de *P. xanthii*, CSEP2707. Este efector candidato muestra un dominio transmembrana y un dominio CFEM muy conservado, característico de proteínas de membrana relacionadas con la patogénesis. Tras la transformación de colonias de *P. xanthii* con la construcción pPK2-2707gfp observamos que la fluorescencia de la fusión CSEP2707-GFP co-localizaba con la membrana plasmática de las hifas de *P. xanthii*. El análisis de la localización mostró que CSEP2707 sólo se localizaba en la periferia de las colonias transformadas. Analizando en detalle la localización de CSEP2707 mediante CLSM se observó que el marcaje se localizaba exclusivamente en las hifas en crecimiento, ya que en haustorios y en hifas maduras no se observó fluorescencia.

Los resultados mostraban que *P. xanthii* era capaz de ser transformado con diferentes construcciones a través del haustorio. Además, los análisis moleculares demostraban la presencia e integración del T-DNA en el genoma de *P. xanthii*. Pero, ¿el T-DNA era efectivamente capaz de translocarse desde *A. tumefaciens* al citoplasma de la planta y desde allí finalmente viajar a las células del hongo? Para la translocación del T-DNA *A. tumefaciens* forma el complejo-T compuesto por el T-DNA y las proteínas Vir, VirD2 y VirE2. Estas proteínas son responsables de conducir el T-DNA al núcleo e integrarlo en el genoma del huésped. Para clarificar el proceso de transformación de haustorios, se decidió estudiar la localización de la proteína VirD2 mediante su fusión a GFP. Tras la expresión en planta de la fusión GFP-VirD2 observamos que la fluorescencia se localizaba tanto en haustorios de *P. xanthii* como en el núcleo de hifas, demostrando que *P. xanthii* era capaz de tomar el complejo-T desde el citoplasma de planta para posteriormente ser incorporado al genoma del hongo. Los resultados obtenidos demuestran la fiabilidad de estos métodos para la transformación de *P. xanthii* y

abre una nueva vía para el estudio de los oídios, permitiendo, por ejemplo, la realización de estudios de localización de proteínas fúngicas sin la intermediación de la planta como hasta ahora.

Hasta el momento se han identificado numerosos efectores de hongos filamentosos, sin embargo, son pocos los identificados en oídios y muchos menos en los que se ha determinado papel que desempeñan en la interacción hongo-planta. Debido a la necesidad de identificar el panel de efectores y lo que es más importante, su función en la interacción, se desarrolló una metodología para el análisis funcional de efectores candidatos de *P. xanthii*. Para determinar el papel como verdaderos efectores de los efectores candidatos identificados en el secretoma epifítico de *P. xanthii*, se desarrolló un método de silenciamiento génico inducido por el hospedador mediante *Agrobacterium tumefaciens* (AtM-HIGS, su acrónimo en inglés) sobre cotiledones de melón (capítulo 5). El análisis del desarrollo del hongo tras el silenciamiento mediante una tinción de sus estructuras fúngicas como el azul toluidina, reveló diferentes tipos de respuesta en el desarrollo de la infección. El análisis estadístico de los recuentos de haustorios por milímetro cuadrado a diferentes tiempos tras la inoculación agrupó a los efectores en cinco fenotipos según el efecto negativo de su silenciamiento sobre el crecimiento del hongo: ninguno, bajo, intermedio, alto y muy alto. Así, el silenciamiento de CSEP2838 no produjo ningún efecto significativo en comparación con el control negativo (vector vacío). En los casos de CSEP3171 y CSEP7690, el silenciamiento produjo un efecto negativo bajo sobre el crecimiento del hongo. El silenciamiento de CSEP2835 causó un efecto negativo intermedio. Por último, se observó un efecto negativo alto en los silenciamientos de CSEP2707 y CSEP2718 y muy alto en los silenciamientos de CSEP1984 y CSEP2978.

Además, el silenciamiento de los deferentes efectores candidatos analizados provocó diferentes efectos sobre la acumulación en las células de la planta de compuestos relacionados con la respuesta de defensa, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que sugiere el desempeño de diferentes papeles en el establecimiento de la infección según el efector. En este caso, la agrupación de los efectores según la respuesta defensiva de la planta mostró un resultado similar a lo observado para el desarrollo del hongo. En el caso de CSEP2838 no se observó una respuesta significativa con respecto al control negativo, mientras que el del resto de efectores provocó distintas respuestas, significativamente diferenciables del control.

El principal problema del estudio funcional de los efectores de los oídios es el escaso número de proteínas con función anotadas. Este problema hace muy difícil dilucidar la función que desempeñan estas proteínas. Sin embargo, en los últimos años, los análisis y las predicciones bioinformáticas han resultado ser herramientas muy útiles para predecir la función de proteínas nuevas. Es por ello, que en este trabajo hemos empleado un conjunto de herramientas informáticas para la predicción de modelos 3D de los CSEP, así como para la identificación de sus posibles ligandos y funciones. Basándonos en las predicciones, obtuvimos que CSEP2838 pudiera tener una gran similitud estructural con una cupredoxina de pepino, lo que sugiere que podría actuar como un transportador de electrones posiblemente en la matriz extrahaustorial, ya que presenta péptido señal de secreción. El caso de CSEP2835 es muy interesante. Es un efector candidato con un dominio cerato-platanin, característico de proteínas con papel en la patogénesis. El papel que desempeña este tipo de proteínas es muy variado desde su participación en el desarrollo del hongo, protección de la pared celular o interacción con las respuestas de defensa del hospedador. Según las predicciones bioinformáticas, CSEP2835 podría actuar secuestrando fragmentos de celulosa

liberados como consecuencia de la degradación de la pared celular de la planta por la actividad de las enzimas del patógeno, evitando que se activen los mecanismos de defensa de la planta.

CSEP1984 tiene alta homología con la proteína humana Alix y su ortólogo en la levadura Bro1. Estas proteínas también están presentes en las plantas y se caracterizan por participar en procesos esenciales para la vida vegetal como el tráfico de endosomas y cuerpos multivesiculares, la prevención de la apoptosis, regulación del tráfico de fosfato, el tráfico intracelular y la degradación de proteínas de membrana. Este tipo de actividad, regulando todos estos procesos en la planta, sería de gran utilidad para el patógeno, ya que en el sitio de intento de penetración de la célula huésped, la planta acumula gran cantidad de vesículas con compuestos antifúngicos. Además, en estos patógenos se ha observado la capacidad para inhibir la muerte celular programada. Es llamativa la homología estructural que presenta CSEP1984 con ALIX de melón a pesar de ser completamente diferentes a nivel de secuencia. El análisis del transcriptoma epifítico de *P. xanthii* reveló la presencia de dos proteínas adicionales con dominio ALIX. Sin embargo, a pesar de presentar gran homología a nivel de secuencia de nucleótidos, las proteínas son completamente distintas en estructura y en secuencia aminoacídica. La imitación de la estructura y función de la proteína ALIX de melón nos lleva a pensar en una estrategia de mimetismo por parte de *P. xanthii* para manipular procesos celulares básicos de la planta. Esta estrategia de mimetismo de proteínas ha sido observada en otros patógenos.

En el caso de CSEP2707, este efector candidato presenta un dominio CFEM, característico de proteínas de membrana relacionadas con patogénesis. Un aspecto realmente interesante es la estructura de su secuencia, que tiene una región N-terminal similar a proteínas CFEM y una región homóloga a proteínas sensoras de estrés en el extremo C-terminal. Los resultados obtenidos de las predicciones

sugieren que CSEP2707 podría jugar un papel como sensor de *P. xanthii*, ya que su extremo extracelular es el similar a las proteínas sensoras de estrés. Además, esta región contiene un dominio de baja complejidad rico en Gly/Asp, relacionado con la interacción con otras proteínas y ligandos. Esta hipótesis está en consonancia con la descrita por varios autores que sugieren que las proteínas CFEM actuarían como sensores de la superficie de la planta.

Otro dato interesante es el papel que podría desempeñar CSEP2718 en la interacción patógeno-planta como una posible metiltransferasa de acuerdo con las predicciones de la informática. Por otra parte, su estructura es muy similar a Sp1, una pequeña proteína (29 aminoácidos) de humanos, que actúa como un factor de transcripción en el control de muchos procesos inmunes. Las predicciones de ligandos indican que CSEP2718 se une potencialmente a adenina, péptidos y S-adenosilmetionina. Curiosamente, las metiltransferasas se caracterizan por su capacidad para transferir grupos metilo de un donante, tal como S-adenosilmetionina, a un receptor que puede ser proteína, como las histonas, ADN o ARN, concretamente los residuos de adenina y citosina. Estudios anteriores han demostrado que estas modificaciones epigenéticas son explotadas por varios patógenos, que secretan metiltransferasas como efectores en el interior de células del huésped, provocando la desregulación de la expresión de ciertos genes. En una línea similar se enmarca el papel de CSEP2978, cuyo modelo 3D y las predicciones de ligando, indican que podría actuar como un factor de transcripción. Por desgracia, no se encontró homología con ninguna estructura cristalina en bases de datos de proteínas. La posibilidad de que *P. xanthii* pudiera disponer de efectores con papel en la regulación de la transcripción no sería tan extraño, ya que se conocen varios ejemplos de infecciones en las que se han observado cambios transcripcionales modulados por los patógenos para mejorar su propia supervivencia.

De acuerdo con la homología del modelo 3D y las predicciones informáticas, CSEP3171 podría ser una α -manosidasa y tendría a α - y β -manosa como ligandos. Este tipo de actividad y ligandos son características de *exo- α -manosidasa*, cuya actividad es el procesamiento de la manosa de los enlaces N-glicanos. La N-glicosilación es un proceso importante para la estructura como para la actividad de algunas proteínas de eucariotas. Por tanto, un efector con este tipo de actividad sería de gran utilidad para el patógeno puesto que le permitiría poder alterar la actividad de algunas proteínas de la planta.

Es bien conocido que el papel de los efectores de hongos no es únicamente suprimir las respuestas de defensa de la planta, sino también para modular la fisiología y la arquitectura de la célula huésped para acomodar la estructura invasiva del hongo como es el haustorio. En este contexto, el modelo 3D de CSEP7690 sugiere un papel muy interesante para este efector en el establecimiento de la infección. Este efector candidato presenta una alta homología estructural con el dominio F-BAR de tirosina quinasa humana y el dominio F-BAR de *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas que están relacionadas con la remodelación de las membranas celulares, la biogénesis de orgánulos, el tráfico de membrana, la morfología celular y una variedad de procesos basados en actina. Por tanto, la estructura hipotética de este efector sugiere un papel muy interesante desde el punto de vista del establecimiento del haustorio, pudiendo actuar sobre las rutas de remodelación de las membranas de la planta.

Tras los resultados obtenidos podemos concluir que el silenciamiento génico inducido por hospedador mediado por *A. tumefaciens* (AtM-HIGS) es un método fiable para el estudio del papel de los efectores candidatos de *P. xanthii* en la interacción hongo-planta, que ha permitido determinar que los efectores ensayados participan de distinta forma en la interacción patógeno-planta manipulando las respuestas de defensa de la planta. De esta forma, hemos

establecido un "flujo de trabajo" eficaz para la caracterización de los efectores candidatos de *P. xanthii* basándonos en el análisis combinado de su función *in vivo* mediante AtM-HIGS y su función *in silico* mediante el empleo de un conjunto de herramientas bioinformáticas para la modelización de estas proteínas y la predicción de interacciones proteína-ligando. Los resultados nos han permitido formular diversas hipótesis sobre el papel que los diferentes CSEP de *P. xanthii* podrían desempeñar en la interacción. Obviamente, estudios funcionales adicionales tienen que llevarse a cabo para determinar la función exacta de estos efectores en la patogénesis de *P. xanthii*.

Tras la puesta a punto de un método de silenciamiento de los efectores de *P. xanthii* en cotiledones de melón mediante *A. tumefaciens*, llevamos a cabo el análisis de una familia de doce efectores candidatos de *P. xanthii* (capítulo 6). El análisis de las secuencias aminoacídicas de los doce miembros de la familia mostró que sus secuencias son prácticamente idénticas salvo el extremo carboxilo terminal que contiene una región de baja complejidad, lo que permite clasificarlas en 5 grupos filogenéticos. Además, la comparación de las secuencias con sus homólogos en *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Golovinomyces orontii* y *Erysiphe pisi*, indica que están muy conservadas, incluso a nivel de nucleótidos, entre especies cercanas. Los análisis mediante BLASTx mostraron que estas proteínas están ampliamente distribuidas entre diferentes especies de hongos filamentosos, todos ellos hongos patógenos. El análisis de la expresión de representantes de cada uno de los grupos mostró que su expresión aumentaba en los primeros momentos de la infección, coincidiendo con la penetración de la célula huésped, disminuyendo durante el desarrollo del haustorio. Este patrón de expresión está correlacionado con la expresión de genes de defensa en planta, cuya expresión alcanza su máximo en el momento de penetración del hongo.

Para analizar el papel de estos efectores en el desarrollo de la infección y en la respuesta de defensa de la planta llevamos a cabo el silenciamiento simultáneo de todos ellos y de un miembro de cada uno de los grupos que componen esta familia mediante el sistema AtM-HIGS. Analizando el desarrollo del hongo tras el silenciamiento, observamos que el número de haustorios por milímetro cuadrado respecto al control disminuía y se hacía más patente a las 120 horas tras la inoculación. El efecto negativo sobre el crecimiento del hongo variaba, no obstante, según el grupo silenciado, siendo muy notorio en el caso del silenciamiento simultáneo de los doce miembros de la familia. Resultó muy interesante el efecto sobre la colonia fúngica, mostrando un desarrollo más compacto y los puntos de penetración más cercanos entre sí en comparación con las hojas agro-infiltradas con el vector vacío. En el caso del análisis de la respuesta de defensa de la planta, el silenciamiento mostró que cada grupo que compone esta familia tiene un papel diferente en la interacción con el hospedador. Su silenciamiento se traduce en un aumento del número de células que acumulaban H_2O_2 y calosa. Además, el silenciamiento del conjunto de todos los miembros aumentó drásticamente la respuesta de defensa de la planta, lo que indicaba que sus actividades son sumatorias y no independientes.

Ante la falta de homología con proteínas funcionalmente anotadas se llevó a cabo el análisis bioinformático. El modelaje con I-TASSER y el análisis bioinformático mostraron una gran homología estructural con el cristal de varias quitinasas. Además, las predicciones de ligando indicaban que se trataba de proteínas que tenían como sustrato N-acetilglucosamina, monómero que conforma la quitina, compuesto mayoritario de la pared celular de los hongos, insectos y crustáceos. Estas predicciones preliminares se tornaron en certezas tras realizar ensayos de degradación de quitina *in vitro* con proteína purificada a partir de su expresión en *Escherichia coli*. Los ensayos de turbidez mostraron que la turbidez

de las suspensiones de quitina coloidal disminuía en presencia de estas proteínas. Además, el ensayo de liberación de azúcares reducidos, demostró la actividad de estos efectores candidatos liberando este tipo de compuestos, que es característico de la actividad de las quitinasas. Por otro lado, los ensayos de afinidad frente a diferentes concentraciones de quitina coloidal mostraron la afinidad de estos efectores candidatos por la quitina. Estos resultados indicaban que estos efectores tenían actividad quitinasa.

Tras los resultados obtenidos surgió la pregunta de qué papel desempeñaban estos efectores en la interacción *P. xanthii*-cucurbitáceas. Tal y como se ha visto en otros sistemas, los hongos patógenos son capaces de ocultar compuestos de su pared celular que sean reconocidos por receptores del hospedador, evitando de esta manera activar las respuestas de defensa de la planta. Por ello, nos planteamos que el papel de esta familia de efectores reside en la degradación de fragmentos de quitina, un reconocido patrón molecular asociado al patógeno (PAMP), que se libera de la pared celular del hongo como consecuencia de la actividad de las quitinasas de la planta, evitando que se active la inmunidad disparada por quitina. Para corroborar dicho planteamiento, se llevó a cabo el doble silenciamiento del conjunto de efectores y el principal receptor de quitina de la planta, CERK1. Los resultados mostraron que, en ausencia de CERK1, la respuesta de defensa de la planta disminuía significativamente a pesar de estar silenciados estos efectores, lo que demuestra el papel de éstos en la interacción es evitar el reconocimiento de los fragmentos de quitina del hongo. Además, la localización de dos de estos efectores CSEP2158 (grupo 2) y CSEP5191 (grupo 3) mostró que ambos efectores se localizaban en la papila de la planta, co-localizando con polímeros libres de quitina acumulados como consecuencia de la degradación de la quitina del hongo por las quitinasas de la planta.

Tras los resultados obtenidos concluimos que esta familia de doce efectores está ampliamente distribuida sólo y exclusivamente en hongos patógenos. Además, participa en la interacción con la planta, actuando como quitinasas secretadas por el patógeno y degradando los fragmentos de quitina liberados de la pared celular del hongo y evitando la inmunidad disparada por quitina. Por consiguiente, estos efectores fueron designados como proteínas ECHA, acrónimo de las siglas “effectors with chitinase activity”.

El análisis del secretoma epifítico de *P. xanthii* permitió identificar un transcrito codificante para una quitina deacetilasa, *PxCDA*. Las quitinas desacetilasas son enzimas responsables de la modificación de la quitina de la pared celular fúngica, hidrolizando el grupo acetamido de las unidades de N-acetilglucosamina, para obtener quitosano, una molécula menos accesible a las quitinasas de la planta. De esta forma, la quitina de la pared celular del hongo es ocultada de la percepción de la planta, evitando así la activación de la inmunidad disparada por quitina. A pesar de ser una proteína identificada en numerosos hongos filamentosos e incluso en insectos, su papel en la interacción planta-patógeno no ha sido analizado. Por ello llevamos a cabo ensayos de silenciamiento de *pxcda* mediante el sistema AtM-HIGS en cotiledones de melón (capítulo 7).

El silenciamiento de *PxCDA* resultó en la completa inhibición del crecimiento del hongo, observándose una disminución de casi la mitad del porcentaje de superficie infectada en comparación con las plantas control. Visualizando las estructuras fúngicas mediante toluidina se observaron conidias con un tubo germinativo y un haustorio inmaduro. Sin embargo, la infección era totalmente frenada puesto que no se observaban hifas secundarias. Además, el análisis de la respuesta de defensa de la planta mostró que tras el silenciamiento de *PxCDA* se

producía un aumento drástico de la acumulación de H_2O_2 en el interior de las células vegetales que interactuaban con el hongo.

Tal y como se realizó en el análisis de la familia de quitinasas de *P. xanthii*, los efectores ECHA, se llevó a cabo el doble silenciamiento de *PxCDA* y el receptor de quitina de melón *CERK1*. Los resultados mostraron la reversión del crecimiento del hongo y la disminución del número de células de la planta que acumulaban H_2O_2 . Incluso se observó muerte celular en las células de la planta donde el patógeno había intentado fallidamente penetrar. Todo esto indicaba que el efecto negativo del silenciamiento de *pxcda* sobre el crecimiento del hongo estaba asociado a la activación de la inmunidad disparada quitina. Además, el análisis de la localización subcelular de estas proteínas mediante su fusión a GFP mostró que la fluorescencia se localiza en la pared celular del hongo desde el desarrollo de la clavija de penetración hasta la formación del haustorio inmaduro, estando ausente en el haustorio maduro, lo que indicaba que el papel que desempeñan estas proteínas estaba restringido a las fases más tempranas e íntimas de la interacción.

Consecuencia de la actividad deacetilasa de estas proteínas se libera acetato. En trabajos previos se había demostrado que la acumulación de acetato produce la inhibición de la actividad quitina deacetilasa *in vitro* como consecuencia de un fenómeno de retroalimentación negativa. Además, compuestos derivados del acetato, los denominados ácidos carboxílicos, como el ácido acético y ácido láctico, también han resultado ser inhibidores de la actividad quitina deacetilasa. Es por ello que decidimos llevar a cabo ensayos de inhibición del crecimiento de *P. xanthii* en discos de melón tratados con diferentes concentraciones de ácido acético, láctico y EDTA (un derivado del acetato). La medición de los diámetros de las colonias mostró que la aplicación de estos compuestos tanto antes como después de la inoculación de *P. xanthii* producía una inhibición del desarrollo de

la infección. Los resultados mostraron que a concentraciones bajas de 0,5 mM se obtenía cierta reducción en el crecimiento y a concentraciones de 20 y 50 mM la completa inhibición del mismo. Además, los análisis del porcentaje de superficie infectada mostraron que la aplicación de EDTA reducía drásticamente el desarrollo de la infección. Analizando la respuesta de defensa de la planta obtuvimos resultados similares al silenciamiento de *PxCDA*, observándose acumulación de H_2O_2 en las células vegetales penetradas por el patógeno e incluso muerte celular.

El efecto negativo sobre el crecimiento del hongo y la respuesta de defensa de la planta se asemejaban a los resultados obtenidos en el silenciamiento de *pxcda*, lo que sugería la activación de la inmunidad disparada por quitina como consecuencia de la inhibición de la actividad quitina deacetilasa. Por ello, al igual que se realizó para el silenciamiento de *pxcda*, se llevó a cabo el tratamiento con EDTA sobre cotiledones donde se había realizado previamente silenciamiento del receptor de quitina *CERK1*. Los resultados fueron similares a los del doble silenciamiento *PxCDA/CERK1*, observándose la reversión del crecimiento fúngico como consecuencia de una drástica disminución de la respuesta de defensa de la planta.

La estructura de *PxCDA* es muy similar a otras quitinas deacetilasas de hongos filamentosos. Además, a pesar de que la secuencia aminoacídica difiera de una especie a otra, los dominios activos están muy conservados. Los ensayos de inhibición con EDTA llevados a cabo sobre infecciones causadas por *Botrytis cinerea* en fresa y *Penicillium digitatum* en naranjas demostró el papel inhibitorio de los ácidos carboxílicos es similar entre diferentes quitinas deacetilasas. Además se demostró que el efecto inhibitorio del EDTA no se debe a un efecto tóxico o a su papel como quelante, sino a su unión al centro activo de la enzima, bloqueando su actividad, como sugieren los resultados del análisis docking.

El análisis de los transcritos derivados del gen *PxCDA* demostró la transcripción de una segunda quitina deacetilasa de *P. xanthii*. El análisis de ambas secuencias nucleotídicas mostró que la presencia de esta segunda forma molecular se debía a un fenómeno de splicing alternativo. Para determinar la actividad de ambas enzimas se llevaron a cabo ensayos de actividad frente a quitina coloidal *in vitro*. Los ensayos mostraron diferencias en la actividad entre ambas enzimas en el tiempo. Mientras PxCDA2 alcanzaba su máximo de actividad a los 15 min de lanzar la reacción, PxCDA1 alcanzaba su máximo a los 45-60 min. Esta diferencia en la actividad hacia el mismo sustrato se debe posiblemente a las diferencias estructurales de su dominio de unión a quitina. Además, los ensayos de afinidad frente a diferentes concentraciones de quitina coloidal demostraron lo predicho por los modelos, mostrando PxCDA2 mayor afinidad por la quitina que PxCDA1. Finalmente, tras analizar la actividad de ambas PxCDA llevamos a cabo ensayos de actividad en ausencia y presencia de EDTA a 10 y 20 mM, demostrándose que la presencia de EDTA disminuye la actividad quitina deacetilasa en ambas enzimas.

Por otro lado, el análisis de los transcritos obtenidos reveló también la presencia de un transcrito de menor tamaño que los anteriores. Este transcrito también tenía su origen en un fenómeno de splicing alternativo, provocando que la proteína pidiera el dominio de actividad deacetilasa, conservando sólo el dominio de unión a quitina. Los ensayos de afinidad a quitina coloidal llevados a cabo mostraron que esta proteína tenía afinidad por la quitina, por ello la denominamos CHBE1 (“chitin-binding effector”). En *Cladosporium fulvum* se identificaron dos proteínas con afinidad por la quitina coloidal pero con distinto papel, Avr4 y Ecp6. El efector Avr4 actúa uniéndose a la quitina de la pared celular fúngica, protegiendo a ésta de la actividad quitinasa de la planta. En cambio el efector Ecp6, actúa barriendo polímeros de quitina liberados como consecuencia de la

actividad de las quitinasas de la planta, evitando así su reconocimiento por los receptores de la planta. Para determinar qué papel desempeñaría CHBE1 se llevaron a cabo ensayos de protección de la pared fúngica frente a una quitinasa comercial. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que CHBE1 no protege al hongo de la actividad de las quitinasas. En paralelo, se llevaron a cabo ensayos de infiltración de plantas con quitina coloidal en presencia y ausencia de CHBE1. Los resultados obtenidos mostraban que CHBE1 protegía a la quitina de la percepción de la planta y, por tanto, de la activación de la inmunidad disparada por quitina. Además, los ensayos de localización subcelular mediante su fusión a GFP mostraron que CHEB1 se localizaba en la papila, co-localizando con la quitina liberada de la pared del hongo al igual que los efectores ECHA. Estos resultados nos permiten concluir que CHEB1 es un homólogo funcional de Ecp6, siendo responsable de ocultar los fragmentos de quitina liberados a los receptores de la planta.

En definitiva, en esta Tesis Doctoral hemos realizado un estudio detallado del desarrollo del haustorio de *P. xanthii* (capítulo 2); se han desarrollado dos métodos de transformación transitoria de este patógeno mediante *A. tumefaciens*, que implican la transformación directa de conidios (capítulo 3) y la transformación indirecta de haustorios (capítulo 4), respectivamente; se ha puesto a punto un sistema de silenciamiento génico inducido por hospedador mediado por *A. tumefaciens* (AtM-HIGS) que ha permitido el análisis funcional de un conjunto de efectores candidatos de *P. xanthii* y que junto al modelado *in silico* de las proteínas y a la predicción de interacciones proteína-ligando, no han permitido formular hipótesis sobre el papel de estos efectores en la interacción patógeno-planta (capítulo 5); se ha caracterizado una familia de efectores con actividad quitinasa (proteínas ECHA) que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, estando presente en la mayoría de hongos patógenos, lo que refleja su

importancia en la interacción patógeno-planta como factores necesarios para eludir la activación de la inmunidad disparada por quitina (capítulo 6); se identificó a quitina deacetilasa como una proteína clave para la patogénesis ya que su silenciamiento génico o su inhibición activan la inmunidad disparada por quitina y bloquean el desarrollo, lo que la convierten en una diana ideal para el desarrollo de nuevos fitosanitarios (capítulo 7); por último, se ha caracterizado una versión truncada de quitina deacetilasa originada mediante splicing alternativo y que mantiene el dominio de unión a quitina, cuyo papel sería el secuestro de fragmentos de quitina para evitar su reconocimiento por parte de la planta y la consiguiente activación de los mecanismos de defensa correspondientes (capítulo 7).

CONCLUSIONS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The main conclusions derived from this work were as follows:

1. Haustorial lobes of *Podosphaera xanthii* are primarily responsible for vesicle trafficking and most likely act as major mediators of the fungus-plant dialogue.

2. *Agrobacterium tumefaciens* is a useful, reliable and reproducible tool for transient transformation of *P. xanthii*, which allows, for example, studies location effectors.

3. This work describes for the first time the transformation of haustoria with *A. tumefaciens* as a tool for transient transformation of haustoria-forming fungi. In *P. xanthii*, this strategy is more effective than the direct transformation of conidia.

4. The host induced gene silencing by *A. tumefaciens* (AtM-HIGS) is a very useful tool for the identification of effectors from *P. xanthii*.

5. Candidates effectors CSEP1984, CSEP2707, CSEP2718, CSEP2835, CSEP2978, CSPE3171 and CSEP7690 are bona fide effectors of *P. xanthii* although they contribute differently to the pathogenesis.

Conclusions

6. During the penetration of the host, *P. xanthii* secretes a family of at least twelve chitinases apparently responsible for the degradation of chitin-oligomers released from the fungal cell wall by the action of plant chitinases, which contributes to arrest the activation of chitin-triggered plant immunity.

7. These chitinase called ECHA and identified for the first time in this study, are widely distributed among different species of plant pathogenic fungi, animals and opportunistic, suggesting a central role in the interaction with the host.

8. Chitin deacetylases from *P. xanthii* are essential proteins to hide the pathogen from the innate immune mechanisms of plants.

9. In addition, inhibition assays with different carboxylic acids suggest that chitin deacetylases are potentially very interesting targets for the development of new phytosanitary.

10. In this work a chitin binding protein lacking the typical LysM domain has been identified for the first time. This effector from *P. xanthii* called CHEB1 is a truncated version of a chitin deacetylase, as result of a process of alternative splicing. This effector would be responsible for the sequestration of chitin polymers released at the fungal penetration point, preventing the activation of the chitin-triggered immunity.

CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Las principales conclusiones derivadas de este trabajo fueron los siguientes:

1. Los lóbulos del haustorio de *Podosphaera xanthii* son los principales responsables del tráfico de vesículas y muy probablemente actúan como los principales mediadores del diálogo hongo-planta.
2. *Agrobacterium tumefaciens* es una herramienta útil, fiable y reproducible para la transformación transitoria de *P. xanthii*, que ha permitido, por ejemplo, la realización de estudios de localización de efectores.
3. En este trabajo se ha descrito por primera vez la transformación de haustorios mediante *A. tumefaciens* como herramienta para la transformación transitoria de hongos formadores de haustorios. En *P. xanthii* esta estrategia es más eficaz que la transformación directa de conidios.
4. El silenciamiento génico inducido por hospedador mediante *A. tumefaciens* (AtM-HIGS) es una herramienta muy útil para la identificación de efectores de *P. xanthii*.

5. Los efectores candidatos CSEP1984, CSEP2707, CSEP2718, CSEP2835, CSEP2978, CSPE3171 y CSEP7690 son verdaderos efectores de *P. xanthii* aunque contribuyen de distinta manera a la patogénesis.

6. Durante la penetración del huésped, *P. xanthii* secreta una familia de al menos doce quitinasas que parecen ser responsables de la degradación de los oligómeros de quitina liberados de la pared celular del hongo por la acción de quitinasas de la planta, evitando así la activación de la inmunidad disparada por quitina.

7. Estas quitinasas, denominadas ECHA e identificadas por primera vez en este estudio, están ampliamente distribuidas entre diferentes especies de hongos patógenos de plantas, de animales y oportunistas, lo que sugiere un papel central en la interacción con el huésped.

8. Las quitina deacetilasas de *P. xanthii* son proteínas fundamentales para la ocultación del patógeno a los mecanismos de inmunidad innata de la planta.

9. Además, los ensayos de inhibición con diferentes ácidos carboxílicos sugieren que las quitinas deacetilasas son dianas potencialmente muy interesantes para el desarrollo de nuevos fitosanitarios.

10. En este trabajo se ha identificado por primera vez una proteína de unión a quitina que carece de los típicos motivos LysM. Este efector de *P. xanthii* denominado CHEB1, es una versión truncada de quitina deacetilasa obtenida mediante splicing alternativo. Dicho efector sería responsable de secuestrar polímeros de quitina liberados en el punto de penetración, evitando la activación de la inmunidad disparada por quitina.