



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Identificación de nuevos componentes de la ruta
TOR de *Fusarium oxysporum* y determinación de
su papel en la patogénesis**

Gesabel Yaneth Navarro Velasco

TITULO: *Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de Fusarium oxysporum y determinación de su papel en la patogénesis*

AUTOR: *Gesabel Yaneth Navarro Velasco*

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

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



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de
Fusarium oxysporum y determinación de su papel en la
patogénesis**

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

Gesabel Yaneth Navarro Velasco

Dirigido por

Dr. Antonio Di pietro
Catedrático

Córdoba, Diciembre de 2013

D. Antonio Di Pietro, Catedrático de Genética de la Universidad de Córdoba

INFORMA

Que el presente trabajo, titulado **“Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de *Fusarium oxysporum* y determinación de su papel en patogénesis”**, realizado por Doña Gesabel Yaneth Navarro Velasco bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Y que para así conste, expido el siguiente informe
Córdoba a 8 de noviembre de 2013



Fdo. Dr. Antonio Di Pietro
Catedrático
Departamento de Genética
Universidad de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de *Fusarium oxysporum* y determinación de su papel en patogénesis

DOCTORANDO/A: Gesabel Yaneth Navarro Velasco

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

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

La proteína quinasa TOR está presente en todos los organismos eucariotas y controla el crecimiento y la proliferación celular en respuesta a nutrientes y otros estímulos ambientales. Actualmente se desconoce el papel de dicha ruta celular en la patogénesis fúngica. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* reveló la existencia de varios genes ortólogos a componentes de la ruta de señalización TOR caracterizados en mamíferos y *Saccharomyces cerevisiae*.

Para estudiar función de estos componentes en el desarrollo y la virulencia de *F. oxysporum*, se crearon una serie de mutantes mediante transformación genética y recombinación homóloga. La inactivación del gen *tsc2* o la inserción de un alelo constitutivamente activo del gen *gtr1* produjeron una sobreactivación de la cascada TOR con múltiples efectos en el fenotipo de los mutantes. En los mutantes *tsc2* se observó una incapacidad de crecer en condiciones limitantes de nutrientes y la falta de respuesta a distintos tipos de estrés. Por otro lado, los mutantes *gtr1* mostraron un crecimiento acelerado y una proliferación celular incrementada. En ambas clases de mutantes, los fenotipos se revirtieron al silvestre tras el tratamiento con rapamicina, un inhibidor específico de TOR,

Con el fin de analizar el papel de la ruta TOR en la patogénesis de *F. oxysporum*, se utilizaron dos modelos de infección: plantas de tomate y larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella*. El segundo modelo se puso a punto en el transcurso de la presente tesis doctoral, y resultó ser un sistema rápido y una alternativa útil al modelo del ratón, para estudiar la infección de *F. oxysporum* en un hospedador animal.

La sobreactivación de la cascada TOR en los mutantes *tsc2* y *gtr1* resultó en reducción significativa de la capacidad de invasión del hospedador y en un retraso significativo en el desarrollo de enfermedad, tanto en plantas como en animales. Por su parte, la complementación del mutante *tsc2* con el alelo silvestre llevó a la recuperación total de la virulencia.

Las conclusiones y resultados muestran que la ruta de señalización TOR juega un papel clave en el desarrollo y la patogénesis. Dada la naturaleza conservada de esta cascada celular en hongos filamentosos, podría utilizarse como nueva diana para controlar las infecciones fúngicas, tanto en cultivos como en pacientes inmunodeprimidos. Todo ello se recoge en un artículo publicado en la revista Fungal

Genetics and Biology y otro en fase de preparación y que será en breve enviado a una revista de alto impacto para su publicación.

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

Córdoba, 5 de noviembre de 2013

Firma del/de los director/es



Fdo.: Antonio Di Pietro

“El señor es mi luz y mi salvación”

Salmo 27:1-9

AGRADECIMIENTOS

A Dios mi señor, en los momentos más difíciles tú has estado conmigo y me has dado la fuerza para seguir luchando.

Deseo agradecer al Prof. Antonio Di Pietro por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo y haber depositado en mí toda su confianza, por su paciencia, consejos y decidido apoyo en este difícil camino de la formación, *¡muchísimas gracias!*

Mi agradecimiento muy especial a las Profas. Reyes, Concha, Encarna, Carmela, por todo su apoyo y su cariño mostrado hacia mí en todo momento. Gracias por preocuparse siempre por mí.

Quiero destacar el gran apoyo a todos mis compañeros del labo, por haberme prestado su ayuda siempre que la necesité, y haberme enseñado todo esas cosas. A los amigos de Córdoba y del máster.

Mi agradecimiento a nuestra secretaria M^a Carmen, siempre dispuesta a ayudarme en todo, así como a Inés Molina del departamento de Bioquímica en aquellos primeros años. Al Dr. Emilio Fernández Reyes, gracias por abrir las puertas a esta Universidad.

Gracias a todos y cada una de las personas que han estado a mi lado en estos años, y me han ayudado en este trabajo.

Por estar a mi lado estos años, en los momentos más difíciles, tú has estado conmigo. Dios te bendiga siempre Humberto.

Me gustaría dedicar este trabajo a mi país Panamá, por todo su apoyo durante estos años. A mis padres y hermanos, que aunque en la distancia siempre han estado conmigo, por todo su sacrificio y su apoyo en mi vida, a ellos mi eterno cariño y amor.

Mi recuerdo y cariño a Córdoba "tierra de cielos azules sin nubes"

R. H.

Índice general

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. <i>Fusarium oxysporum</i>	6
1.1. Taxonomía y ciclo de vida.....	6
1.2. Desarrollo y control de la enfermedad.....	9
1.3. Mecanismos de infección.....	11
1.4. Mecanismos de defensa de la planta.....	12
1.5. Reconocimiento planta-patógeno.....	13
1.6. Genes fúngicos importantes para la infección.....	15
1.7. <i>Fusarium</i> como patógeno oportunista de mamíferos.....	17
2. La ruta TOR (Target Of Rapamycin).....	20
2.1. TOR es un regulador central del crecimiento celular.....	20
2.2. Mecanismos de regulación de la ruta TOR.....	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Material biológico.....	27
2. Medios de cultivo.....	28
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	28
2.2. Medios de cultivo para <i>F. oxysporum</i>	29
3. Compuestos químicos.....	30
4. Oligonucleótidos sintéticos.....	30
5. Vectores de clonación.....	31
6. Programas para el análisis de datos.....	32
7. Crecimiento y mantenimiento de organismos.....	32
7.1. Bacterias.....	32
7.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	33
7.3. Plantas.....	33
7.4. <i>Galleria mellonella</i>	34
8. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	34
8.1. Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala con CTAB (minipreps).....	34
8.2. Extracción de ADN genómico de <i>F. oxysporum</i>	35
8.3. Extracción de ADN genómico de tallos y raíces de plantas infectadas.....	36
8.4. Extracción de ADN genómico de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas.....	36
8.5. Extracción de ARN total de <i>F. oxysporum</i>	37

9. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos.....	38
9.1 Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	38
9.2. Defosforilación.....	38
9.3. Ligación de fragmentos de ADN.....	39
10. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	39
10.1. Geles de agarosa.....	39
10.2. Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	40
11. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	40
12. Hibridación y detección de ácidos nucleicos.....	41
12.1. Transferencia de ADN en gel de agarosa para análisis Southern.....	41
12.2. Prehibridación.....	42
12.3. Hibridación.....	42
12.4 Lavados.....	42
12.5 Detección quimioluminiscente.....	43
13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
13.1 Amplificación de fragmentos menores de 4 kb.....	43
13.2. Amplificación de fragmentos mayores de 4 kb.....	44
13.3. Amplificación de fragmentos de alta fidelidad.....	45
13.4. Precipitación de productos amplificados por PCR.....	46
13.5. Transcripción inversa: Síntesis de ADN copia (ADNc).....	47
13.6. PCR de marcaje.....	48
13.7. Cuantificación de ADN genómico en raíces y tallos en plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	48
13.8 Cuantificación de ADN genómico en larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con <i>F. oxysporum</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	50
14. Secuenciación de ADN.....	51
15. Transformación genética de <i>E. coli</i>	51
16. Transformación genética de <i>F. oxysporum</i> y generación de mutantes.....	52
16.1. Obtención de protoplastos: Protocolo basado en el descrito por (Powell y Kistler, 1990), con modificaciones.....	52
16.2. Transformación de protoplastos: Protocolo basado en el descrito por (Malardier <i>et al.</i> , 1989), con modificaciones.....	53
16.3. Generación de un mutante nulo $\Delta rim15$ en <i>F. oxysporum</i>	54
16.4. Generación de la cepa mutante $\Delta slc1a5$ y $\Delta slc7a5$ en <i>F. oxysporum</i>	56
16.5. Generación, por mutagénesis dirigida, de una cepa mutante que expresa un alelo constitutivamente activo ($gtr1^{Q86L}$) de la GTPasa Gtr1 en <i>F. oxysporum</i>	57
16.6. Generación de mutantes nulos $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ y $\Delta sch9 \Delta tsc2$ en <i>F. oxysporum</i>	58

17. Ensayos fenotípicos del crecimiento y desarrollo fúngico.....	59
18. Determinación de la producción de biomasa fúngica.....	61
19. Ensayo de fusión de hifas vegetativas y aglutinación.....	61
19.1. Ensayo de aglutinación de germinulas de <i>F. oxysporum</i>	61
19.2. Cuantificación de fusión de germinulas de <i>F. oxysporum</i>	62
20. Ensayos de crecimiento invasivo.....	62
20.1. Ensayo de penetración de membranas de celofán.....	62
20.2. Colonización de cortes de manzana.....	63
21. Ensayos de infección.....	63
21.1. Infección en plantas de tomate.....	63
21.2. Infección en larvas de <i>G. mellonella</i>	65
22. Métodos bioinformáticos.....	67
Capítulo 1. Modelo de infección de <i>F. oxysporum</i> en el hospedador invertebrado <i>G. mellonella</i>	69
1. Introducción.....	69
2. Resultados.....	71
2.1. La estirpe silvestre de <i>F. oxysporum</i> es capaz de matar y colonizar las larvas de <i>G. mellonella</i>	71
2.2. Distintos mutantes de <i>F. oxysporum</i> difieren en su virulencia en <i>G. mellonella</i>	74
Capítulo 2. Papel de la cascada TOR en desarrollo y patogénesis de <i>F. oxysporum</i>	77
Componentes aguas abajo de TOR.....	77
1. Introducción.....	77
1.1. La proteína quinasa SCH9.....	77
1.2 La proteína quinasa Rim15.....	78
2. Resultados.....	83
2.1. Identificación y características de Rim15 de <i>F. oxysporum</i>	83
2.2. Interrupción dirigida del gen <i>rim15</i>	85
2.3. Crecimiento y desarrollo de los mutantes.....	86
2.4. Funciones asociadas con la infección: fusión de hifas y crecimiento invasivo.....	87
2.5. Rim15 contribuye a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas y animales.....	90
Componentes aguas arriba de TOR.....	93
1. Introducción.....	93
1.1. Los transportadores de aminoácidos SLC7A5 y SLC1A5.....	94
1.2. La GTPasa Gtr1.....	97
1.3. El complejo de esclerosis tuberosa Tsc2.....	103

2. Resultados.....	107
2.1. Los supuestos transportadores de aminoácidos SCL1A5 y SLC7A5...	107
2.1.1. Identificación y características de SCL1A5 y SLC7A5 de <i>F. oxysporum</i>	107
2.1.2. Interrupción dirigida de <i>slc1A5</i> y <i>slc7A5</i>	111
2.1.3. Crecimiento y desarrollo de los mutantes $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc1A5$	113
2.1.4. Funciones asociadas con la virulencia: fusión de hifas y crecimiento invasivo.....	115
2.1.5. SLC1A5 y SLC7A5 contribuyen a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate y en <i>G. mellonella</i>	117
2.2. La GTPasa Gtr1 y la proteína Tsc2.....	119
2.2.1. Identificación y características de Gtr1 de <i>F. oxysporum</i>	119
2.2.2. Obtención de mutantes portadores de un alelo dominante activo <i>gtr1</i> ^{Q66L}	123
2.2.3. Identificación y características de Tsc2 de <i>F. oxysporum</i>	125
2.2.4. Interrupción dirigida del gen <i>tsc2</i> en la estirpe silvestre y en el fondo <i>gtr1</i> ^{Q66L} de <i>F. oxysporum</i>	128
2.2.5. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en el crecimiento y desarrollo de <i>F. oxysporum</i>	130
2.2.6. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la respuesta a estrés.....	139
2.2.7. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la producción de microconidios y morfología de las germinulas.....	141
2.2.8. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la producción de biomasa fúngica.....	144
2.2.9. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la fusión vegetativa de hifas.....	145
2.2.10. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en el crecimiento invasivo.....	146
2.2.11. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la virulencia en plantas de tomate.....	148
2.2.12. Efectos de la mutación de <i>gtr1</i> y <i>tsc2</i> en la virulencia en <i>G. mellonella</i>	152
2.3. La proteína quinasa Sch9.....	154
2.3.1. Identificación y características de Sch9.....	155
2.3.2. Crecimiento y desarrollo de los mutantes $\Delta sch9$ y del doble mutante $\Delta tsc2 \Delta sch9$	157
2.3.3. Sensibilidad a distintos tipos de estrés.....	158
2.3.4. Crecimiento invasivo y virulencia en <i>Galleria</i>	159

DISCUSIÓN	161
1. Modelo de infección de <i>F. oxysporum</i> en el hospedador invertebrado <i>G. mellonella</i>	161
2. Componentes aguas abajo de TOR.....	164
2.1. La proteína quinasa Rim15.....	164
3. Componentes aguas arriba de TOR.....	165
3.1. Las proteínas SLC1A5 y SLC7A5: posible papel en la utilización de aminoácidos y en virulencia.....	167
3.2. Las proteínas Gtr1 y Tsc2 regulan el desarrollo, la respuesta a estrés y la virulencia a través de TOR.....	170
3.2.1. Desarrollo.....	171
3.2.2. Respuestas a estrés.....	174
3.2.3. Crecimiento invasivo y virulencia en plantas y animales.....	176
3.2.4. Papel de la proteína quinasa Sch9.....	177
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	183
ANEXOS	197

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de esporas producidos por <i>F. oxysporum</i>	7
Figura 2. Infección de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en la planta de tomate expresando la proteína fluorescente GFP.....	8
Figura 3. Complejos TOR1 (TORC1) y TOR2 (TORC2) en <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 4. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	64
Figura 5. Durante la infección de las larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas desarrollan una progresiva melanización después de la inoculación con 1.6×10^5 microconidia con la estirpe silvestre de <i>F. oxysporum</i>	65
Figura 6. Ensayo de infección con la cepa silvestre de <i>F. oxysporum</i> en larvas de <i>G. mellonella</i>	72
Figura 7. Interacción entre <i>F. oxysporum</i> y hemocitos de <i>G. mellonella</i>	73
Figura 8. Colonización y muerte de las larvas de <i>G. mellonella</i> por <i>F. oxysporum</i>	74
Figura 9. Papel de diferentes genes en la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en <i>G. mellonella</i>	75
Figura 10. Integración de las señales de nutrientes por Rim15.....	79
Figura 11. Vías que regulan la longevidad en levadura.....	82
Figura 12. Modelo tridimensional teórico de la proteína Rim15 silvestre de <i>F. oxysporum</i> (A) y de las proteínas de <i>S. cerevisiae</i> (B).....	83
Figura 13. Alineamiento de las proteínas Rim15 fúngicas.....	84
Figura 14. Generación de mutantes nulos $\Delta rim15$ en <i>F. oxysporum</i>	86
Figura 15. Fenotipo de colonia.....	87
Figura 16. Agregación de hifas.....	88
Figura 17. Penetración de membranas de celofán.....	89
Figura 18. Crecimiento en tejidos de cortes de manzana.....	90
Figura 19. Mortalidad las plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$, $\Delta rim15\#30$	91
Figure 20. Rim15 contribuye a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> en <i>G. mellonella</i> ..	91
Figura 21. Modelo de señalización por la vía mTOR en mamíferos.....	93
Figura 22. Activación de mTORC1 por absorción de leucina y antiporte de glutamina.....	96
Figura 23. La absorción de aminoácidos esenciales para la señalización de mTOR, el crecimiento celular y la supresión de la autofagia requiere la absorción previa y el posterior eflujo de la glutamina.....	97
Figura 24. Modelo de la transmisión de la señal de aminoácidos.....	99
Figura 25. Modelo de la activación de mTORC1 inducida por aminoácidos.....	100
Figura 26. Representación de las funciones de Vam6 y las GTPasas Rag en la activación de TORC1 por aminoácidos.....	101
Figura 27. El complejo EGO es un importante regulador de TORC1.....	103
Figura 28. Regulación de mTORC1 por TSC1-TSC2 y Rheb.....	104

Figura 29. A. En <i>C. albicans</i> , TSC2 y RHB1 están implicados en el crecimiento filamentosos inducido por hambre de nitrógeno.....	105
Figura 30. Modelo tridimensional teórico de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de <i>F. oxysporum</i> (A y C) y de <i>D. melanogaster</i> (B y D).....	107
Figura 31. Predicción de la topología transmembrana de las proteínas SLC1A5 (A) y SLC7A5 (B) de <i>F. oxysporum</i>	108
Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SLC1A5.....	109
Figura 33. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SLC7A5.....	110
Figura 34. Generación de un mutante nulo $\Delta slc1A5$ en <i>F. oxysporum</i>	112
Figura 35. Generación de un mutante nulo $\Delta slc7A5$ en <i>F. oxysporum</i>	113
Figura 36. Fenotipo de la colonia.....	114
Figura 37. Fenotipo de colonia.....	114
Figura 38. Agregación de hifas.....	115
Figura 39. El ensayo de penetración de celofán.....	116
Figura 40. Ensayo de infección en cortes de manzana.....	117
Figura 41. Virulencia de las estirpes de <i>F. oxysporum</i> sobre las plantas de tomate.....	117
Figure 42. Mortalidad de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$	118
Figure 43. Mortalidad de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$	119
Figura 44. Modelo tridimensional teórico de las proteínas Gtr1 y Gtr2 de <i>F. oxysporum</i> (A y C) y de <i>S. pombe</i> (B y D).....	120
Figura 45. Relaciones filogenéticas entre las proteínas Gtr1 y Gtr2 o/y RagA/B y RagC/D de <i>F. oxysporum</i> y de otros organismos.....	121
Figura 46. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Gtr1 de <i>F. oxysporum</i> con los ortólogos de otros organismos.....	122
Figura 47. Comparación de proteínas Gtr1 de especies fúngicas, RagA de <i>D. melanogaster</i> y RagA/B de <i>H. sapiens</i>	124
Figura 48. Representación esquemática de la generación, mediante mutagénesis dirigida, de cepas mutantes que expresan un alelo constitutivamente activo $gtr1^{Q86L}$ de la GTPasa Gtr1 en <i>F. oxysporum</i>	125
Figura 49. Modelo tridimensional teórico de la proteína Tsc2 silvestre de <i>F. oxysporum</i> y de las proteínas de <i>S. pombe</i> y <i>H. sapiens</i>	126
Figura 50. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Tsc2.....	127
Figura 51. Generación de mutante nulos $\Delta tsc2$, la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ y dobles mutantes $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ en <i>F. oxysporum</i>	129

Figura 52. Analisis de mutante nulos $\Delta tsc2$, la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ y dobles mutantes $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ en <i>F. oxysporum</i>	130
Figura 53. Morfología de la colonia.....	131
Figura 54. Morfología de la colonia en distintas fuentes de nitrógeno.....	132
Figura 55. La reducción del crecimiento de la colonia en el mutante $\Delta tsc2$ es mediada por la fuente de nitrógeno y no por el pH.....	133
Figura 56. Morfología de la colonia en medio suplementado con distintos aminoácidos.....	135
Figura 57. Sensibilidad al estrés térmico.....	139
Figura 58. Sensibilidad al estrés osmótico u oxidativo.....	140
Figura 59. Sensibilidad a estrés de membrana citoplasmática o de la pared.....	141
Figura 60. Morfología de los microconidios.....	142
Figura 61. Morfología de las germínulas a las 6 horas.....	142
Figura 62. Producción de microconidios.....	143
Figura 63. Producción de biomasa.....	144
Figura 64. Frecuencia de fusión vegetativa determinada por agregados de hifas	145
Figura 65. Frecuencia de fusión vegetativa determinada por agregados de hifas por conteo en microscopio.....	146
Figura 66. El defecto de los mutantes en la penetración de celofán se restaura con rapamicina.....	147
Figura 67. Colonización del tejido del corte de manzana.....	148
Figura 68. Síntomas de enfermedad causados por <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.....	149
Figura 69. Mortalidad causada por <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.....	150
Figura 70. Cuantificación de la biomasa fúngica en el interior de las raíces de tomate.....	151
Figura 71. Cuantificación de la biomasa fúngica en el interior de los tallos de tomate.....	152
Figura 72. Mortalidad causada por <i>F. oxysporum</i> en larvas de <i>G. mellonella</i>	154
Figura 73. Modelo tridimensional teórico de las proteínas Sch9 de <i>F. oxysporum</i> (A), de <i>S. cerevisiae</i> (B) y de la proteína S6K de <i>H. sapiens</i> (C).....	155
Figura 74. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Sch9 de <i>F. oxysporum</i> con los ortólogos de otros organismos.....	156
Figura 75. Análisis de los transformantes $\Delta sch9 \Delta tsc2$ mediante PCR utilizando cebadores específicos.....	157
Figura 76. Fenotipo de colonia.....	157
Figura 77. Sensibilidad a distintos tipos de estrés.....	158
Figura 78. Penetración de membranas de celofán.....	159
Figura 79. Ensayo de infección en larvas de <i>G. mellonella</i>	160
Figura 80. Modelo de la regulación de TOR en <i>F. oxysporum</i> y su papel en la virulencia.....	167

Índice de Tablas

Tabla 1. Razas existentes en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	14
Tabla 2. Genes de <i>F. oxysporum</i> que intervienen en patogénesis estudiados por interrupción.....	16
Tabla 3. Genes de <i>F. oxysporum</i> estudiados en la patogénesis vegetal y animal.....	19
Tabla 4. Cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i>	27
Tabla 5. Cepas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> utilizadas en el presente trabajo.....	27
Tabla 6. Cultivares de utilizados en este estudio.....	28
Tabla 7. Material animal utilizado en este estudio.....	28
Tabla 8. Compuestos químicos utilizados.....	30
Tabla 9. Oligonucleótidos sintéticos empleados en este estudio.....	31
Tabla 10. Vectores utilizados en este trabajo.....	31
Tabla 11. Programa para el análisis de datos.....	32
Tabla 12. Condiciones de amplificación para la MBL Taq Polimeasa.....	44
Tabla 13. Condiciones de amplificación para iProof de alta fidelidad de ADN polimerasa.....	45
Tabla 14. Condiciones de amplificación para la Expand High Fidelity PCR System (Roche).....	46
Tabla 15. Condiciones de amplificación de la PCR a tiempo real para la cuantificación de ADN genómico.....	49
Tabla 16. Carga fúngica en larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con diferentes cepas de <i>F. oxysporum</i>	76
Tabla 17. Virulencia de distintos mutantes de <i>F. oxysporum</i> en modelos de insecto, mamífero y planta.....	76
Tabla 18. Fenotipos principales de los mutantes estudiados en el presente trabajo.....	166

RESUMEN

El crecimiento infeccioso de patógenos fúngicos es controlado por distintas señales ambientales, tal como el estado de nutrientes. El hongo *Fusarium oxysporum* es un patógeno del suelo causante de la marchitez vascular, una enfermedad que provoca pérdidas importantes en un amplio rango de especies de plantas. Además, *F. oxysporum* es un patógeno oportunista capaz de producir infecciones en humanos, ello queda reflejado en el aumento de casos de pacientes inmunodeprimidos con infecciones sistémicas que, en algunas ocasiones, son letales. La capacidad de una única cepa de *F. oxysporum* de causar enfermedad tanto en plantas de tomate como en ratones inmunodeprimidos hace que esta sirva de modelo para el análisis genético de la patogenicidad en plantas y animales.

El presente trabajo tuvo como primer objetivo poner a punto el uso de la polilla de la cera *Galleria mellonella* como modelo de infección alternativo al ratón, para profundizar en el estudio de los mecanismos de virulencia de *F. oxysporum* en animales. *F. oxysporum* fue capaz de proliferar en larvas de *G. mellonella* y matar al hospedador tras inyectar microconidios en el hemocele. La mortalidad de las larvas dependía de la dosis de inóculo y fue significativamente más rápida a 30°C que a 37°C. Mutantes de *F. oxysporum* previamente examinados en plantas de tomate y ratones inmunodeprimidos fueron inoculados en *Galleria*, observándose una buena correlación entre los dos modelos animales de infección. Por tanto, *G. mellonella* representa un sistema útil de coste asumible y éticamente aceptable, para el estudio de los mecanismos de virulencia de *F. oxysporum* en animales.

La segunda parte del trabajo se centró en la identificación y caracterización de distintos componentes de la cascada TOR en *F. oxysporum* y el papel de dicha ruta en el desarrollo y la virulencia del hongo. La proteína quinasa TOR está presente en todos los organismos eucariotas y controla el crecimiento y la proliferación celular en respuesta a nutrientes y otros estímulos ambientales. Actualmente se desconoce el papel de dicha ruta en la patogénesis fúngica. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum*, reveló la existencia de genes ortólogos de varios componentes de la ruta TOR caracterizados en mamíferos y en *Saccharomyces cerevisiae*. Para estudiar la función de estos componentes en *F. oxysporum*, se crearon una serie de mutantes mediante transformación genética y recombinación homóloga.

El primer aspecto abordado fue el papel del gen *rim15*, responsable de una quinasa regulada negativamente por TOR, que controla la entrada en la fase de quiescencia G₀. Aunque la delección de *rim15* no tuvo un efecto significativo en el crecimiento y el desarrollo del hongo, sí causó una disminución de los síntomas de enfermedad durante la infección de plantas y de *G. mellonella*.

Por otro lado, se llevó a cabo la mutación dirigida de cuatro componentes que funcionan aguas arriba de TOR: los supuestos transportadores de aminoácidos Slc1A5 y Slc7A5, la GTPasa Gtr1 y el regulador de GTPasas Tsc2 (complejo de esclerosis tuberosa 2). La pérdida de *slc1a5* o *slc7a5* afectó la capacidad de *F. oxysporum* para utilizar determinados aminoácidos tal como la leucina, y causó una disminución de los síntomas de la enfermedad tanto en plantas como en *G. mellonella*. La inactivación del gen *tsc2* o la inserción de un alelo constitutivamente activo de *gtr1* causaron una sobreactivación de la cascada TOR con efectos diferentes en los fenotipos de los mutantes. Los mutantes *tsc2* mostraron una incapacidad de crecer en condiciones limitantes de nutrientes y de responder a distintos tipos de estrés. Por otro lado, los mutantes *gtr1* mostraron un crecimiento y proliferación celular incrementados. En ambas clases de mutantes, la inhibición de TOR mediante rapamicina revirtió los fenotipos. La sobreactivación de TOR en los mutantes *tsc2* y *gtr1* redujo significativamente el crecimiento invasivo y provocó un retraso significativo en el desarrollo de la enfermedad, tanto en plantas como en animales. Los resultados demuestran que la ruta TOR juega un papel clave en el desarrollo y la patogénesis. Dada la naturaleza conservada de esta cascada celular en hongos filamentosos, podría utilizarse como nueva diana para controlar las infecciones fúngicas, tanto en la agricultura como en medicina.

SUMMARY

Infectious growth in fungal pathogens is controlled by environmental cues, including nutrient status. The fungus *Fusarium oxysporum* is a soilborne pathogen that produces vascular wilt disease on a wide range of different crop species. *F. oxysporum* is also considered an opportunistic pathogen able to cause lethal systemic infections in immunodepressed humans. A single strain of *F. oxysporum* can cause disease on tomato plants and immunosuppressed mice, making of it an ideal model for the analysis of virulence on plant and animal hosts.

The first goal of the present work was to establish the use of the wax moth *Galleria mellonella* as an alternative to the mouse model, to study virulence mechanisms of *F. oxysporum* in animal hosts. *F. oxysporum* was able to proliferate in larvae of *G. mellonella* and kill the host when injected as microconidia into the hemocoel. Mortality depended on the dose of inoculum and was significantly more severe at 30°C than at 37°C. Fungal gene knockout mutants previously tested in the tomato and immunodepressed mouse systems were applied in the *Galleria* model revealing a good correlation between the two animal models. Thus, *G. mellonella* represents a useful, cost-effective and ethically acceptable system for testing animal pathogenicity in *F. oxysporum*.

The second part of this work focused on the identification and characterization of components of the TOR cascade in *F. oxysporum*. The TOR protein kinase is conserved in all eukaryotic organisms and controls cellular growth and proliferation in response to nutrients and other environmental factors. Currently, the role of this cellular pathway in fungal pathogenicity is unknown. In *silico* analysis of the genome of *F. oxysporum* revealed the existence of orthologues of several known components of the TOR pathway in mammals and *Saccharomyces cerevisiae*. To study the function of these components in the development and the virulence of *F. oxysporum*, a series of mutants were created by genetic transformation and homologous recombination.

The first approach was to study the role of Rim15 in *F. oxysporum*. Rim15 is a kinase negatively regulated by TOR, that controls entry into the G₀ quiescence phase. Although deletion of *rim15* did not affect growth and development of the fungus, it caused an attenuation of disease symptoms during infection of tomato plants and larvae of *G. mellonella*.

Moreover, we studied the role of TOR signalling pathway by generating mutations in four upstream components of TOR: the putative amino acid transporters Slc1A5 and Slc7A5, the GTPase Gtr1 and the GTPase regulator Tsc2 (tuberous sclerosis complex 2). Deletion of the genes *slc1a5* or *slc7a5* did not affect growth and development of *F. oxysporum*, but impaired the ability to use certain amino acids such as leucine, and caused a decrease in disease symptoms during infection of tomato plants and *G. mellonella*. Inactivation of *Tsc2* or expression of a constitutively active allele of *gtr1* caused hyperactivation of TOR with distinct phenotypical effects. The

$\Delta tsc2$ mutant was unable to grow under nutrient-limiting conditions and to respond to different types of stress. By contrast, the dominant active *gtr1* mutant showed increased growth and cell proliferation. In both mutants, inhibition of TOR with rapamycin reversed the phenotypes. Overactivation of the TOR cascade in *gtr1* and $\Delta tsc2$ mutants significantly reduced the ability of host invasion and caused a significant delay in disease development and mortality, both in plant and animal hosts. These results show that the TOR pathway plays a key role in development and pathogenesis of *F. oxysporum*. Due to the conserved nature of this cellular cascade in filamentous fungi, it could represent a new target for controlling fungal infections both in agriculture and in medicine.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los hongos son una clase de organismos extremadamente versátiles compuesta principalmente de saprófitos que se nutren de la materia orgánica muerta. Algunas especies de hongos han desarrollado un estilo de vida asociado con la habilidad para reconocer y penetrar un hospedador específico, explotar sus reservas de nutrientes, superar sus respuestas innatas de defensa y causar enfermedad. Los organismos susceptibles de ser atacados por hongos se distribuyen en distintos grupos evolutivos desde los eucariotas inferiores a los superiores, principalmente plantas, además de insectos y mamíferos incluyendo humanos (Ortoneda *et al.*, 2004; Prados-Rosales *et al.*, 2006).

El estudio de los mecanismos fundamentales de la patogénesis fúngica requiere modelos que permitan un manejo experimental fácil y una comprobación rápida de las hipótesis. Como modelos de patógenos vegetales foliares se han utilizado especies como *Magnaporthe grisea* y *Ustilago maydis*. Sin embargo, existen actualmente pocos modelos para patógenos del suelo. El género *Fusarium* ofrece la doble oportunidad para estudiar el proceso de infección general y el proceso específico de infección a través de la raíz. Gracias a una estrecha colaboración entre la comunidad investigadora de *Fusarium* basada en el intercambio de protocolos experimentales y de cepas de laboratorio y se han desarrollado diversas herramientas genómicas, entre ellas la completa secuenciación de los genomas de *Fusarium oxysporum* y de otras especies como *F. graminearum*, *F. verticillioides* y *F. solani* (Ma *et al.* 2010). Por todo ello, y por la existencia de sistemas de transformación eficaces, *Fusarium* se ha convertido en un excelente modelo para el estudio del proceso de patogénesis en hongos filamentosos (Di Pietro *et al.* 2003).

1. *Fusarium oxysporum*

1.1. Taxonomía y ciclo de vida

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos hifomicétidos (Subdivisión Deuteromicetos, División Eumicota) (Wollenweber y Reinking, 1935). *Fusarium oxysporum* es un patógeno que causa la marchitez vascular, una enfermedad que afecta a una amplia variedad de cultivos económicamente importantes, aunque la especie también incluye estirpes saprófitas y parásitas de otros organismos (Di Pietro *et al.*, 2003).

En 1946, Snyder *et al.* incluyeron todas las especies de *Fusarium* de la sección *Elegans* en una única a la que denominaron *Fusarium oxysporum*, nombre de la primera especie del grupo que se había descrito. Esta reestructuración de la clasificación original se debió a los cambios morfológicos observados en los aislados de dicha sección al modificarse las condiciones ambientales y de cultivo. Además, la patogenicidad selectiva de los aislados de la sección *Elegans* no estaba relacionada con la variante morfológica que definía a una especie dada. Estos autores definieron el concepto de forma *specialis* (f. sp.) para referirse a cada aislado de *F. oxysporum* con capacidad de infectar una especie, un género o un grupo vegetal restringido. Tal como la cepa que se ha utilizado en este proyecto de tesis que es patógena para el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el cual se llama *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

F. oxysporum produce tres tipos de esporas asexuales: microconidias, macroconidias y clamidosporas (Figura 1). Las microconidias son uni- o bicelulares y suelen ser las más abundantes y frecuentemente producidas por el hongo en cualquier circunstancia, también en los vasos de la planta infectada. Las macroconidias tienen de tres a cinco células y son gradualmente más puntiagudas e inclinadas hacia el extremo. Se encuentran comúnmente en la superficie de la planta muerta. Las clamidosporas, de una o dos células, son esféricas y de pared gruesa, producidas en conidias o en hifas de forma terminal o intercalar. Se desarrollan tanto en cultivos axénicos

como en el hospedador, en los estadios finales de la patogénesis (Agrios, 1997).

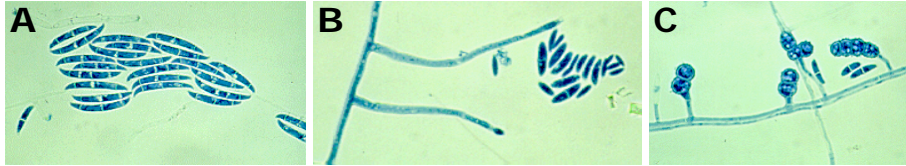


Figura 1. Tipos de esporas producidos por *F. oxysporum*. (A) Macroconidios. (B) Microconidios. (C) Clamidosporas

No hay pruebas de reproducción sexual en este taxón, mientras que si las hay de su propagación clonal (principalmente, la existencia de muchos genotipos sobrerrepresentados en colecciones naturales) de modo que se considera a *F. oxysporum* como exclusivamente mitospórico (Gordon y Martyn, 1997). En distancias cortas *F. oxysporum* se propaga principalmente por irrigación con agua y por equipos contaminados. El hongo también puede propagarse a largas distancias en plantas infectadas, en el propio suelo o en forma de esporas, por el viento (Agrios, 1997).

F. oxysporum se encuentra prácticamente en todos los ecosistemas terrestres; su carácter cosmopolita presenta sin embargo diferentes grados de distribución según las *formae speciales*. Parasita más de 100 especies botánicas, gimnospermas y angiospermas (Agrios, 1997). En sus distintas *formae speciales*, *F. oxysporum*, en sus distintas *formae speciales*, se caracteriza por la producción de distintos síntomas: Marchitez vascular, amarilleo, podredumbre de la raíz o caída y muerte por exceso de humedad (Dutton, 1996; Agrios, 1997; Miller, 2002).

F. oxysporum se comporta como un patógeno típico del suelo. Puede sobrevivir largos períodos de tiempo en el suelo en ausencia del hospedador, principalmente en forma de clamidospora. De hecho, una vez que una zona se infecta con *F. oxysporum*, ésta suele permanecer contaminada indefinidamente. Las plantas sanas pueden infectarse con el hongo si el suelo en el que se encuentra está contaminado. La proximidad de las raíces

induce la germinación y el inicio de la infección. Las raíces se pueden infectar directamente a través de sus ápices, o de heridas o en los puntos de formación de raíces laterales (Agrios, 1997).

Tras la germinación y una vez en el interior, el hongo crece intercelularmente a través de la corteza radical y llega a los vasos del xilema a través de orificios. Cuando alcanza el sistema vascular, invade los vasos y sube por ellos hacia el tallo y la corona de la planta (Figura 2). A medida que crece, el micelio se ramifica y produce microconidios, las cuales suben también por los vasos gracias a la corriente de savia. Tras la germinación, las hifas pueden penetrar las paredes superiores de los vasos xilemáticos, permitiendo la producción de más microconidias en los vasos contiguos (Beckman, 1987).

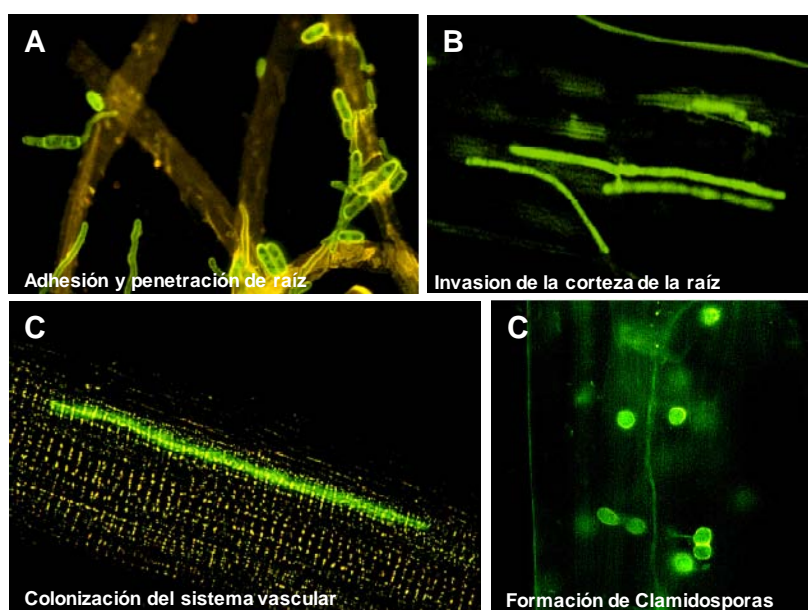


Figura 2. Infección de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la planta de tomate expresando la proteína fluorescente GFP. Germinación de microconidio y penetración de hifas de la estirpe silvestre adheriéndose a la superficie de raíz, 24 horas tras la inoculación (A). Infección de la hifa del hongo creciendo en la corteza de la raíz, 5 días después de la inoculación (B); y en el interior de los vasos del xilema, 7 días después de la inoculación (C). Clamidospora del hongo producidas en el tejido muerto de la planta (Di Pietro *et al.*, 2001).

Mientras la planta permanece viva, el hongo queda restringido a los tejidos xilemáticos y a unas pocas células adyacentes; Cuando la planta muere y los niveles de carbohidratos en los tejidos del hospedador disminuyen, el hongo invade el tejido parenquimático vegetal hasta que finalmente alcanza la superficie de la planta donde produce numerosas clamidosporas intercaladas en las hifas, en los tubos de germinación o en los macroconidios (Agrios, 1997). Cuando los tejidos vegetales caen por marchitez y desecación, estas clamidosporas vuelven al suelo donde pueden sobrevivir muchos años. *Fusarium* puede actuar sólo o más frecuentemente en asociación con otros hongos patógenos del suelo, como *Rhizoctonia* o *Pythium* (Benhamou et al., 2002).

1.2. Desarrollo y control de la enfermedad

La marchitez vascular por fusariosis vascular aparece primero como un ligero aclarado del nervio en la parte exterior de las hojas más jóvenes, seguido de epinastia de 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 síntomas. En plantas de mayor tamaño, aparecen con frecuencia el atrofiamiento y amarilleo de las hojas inferiores, la formación de raíces adventicias, la marchitez de las hojas restantes y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 1997). La infección, generalmente se desplaza hacia arriba a través de la planta. El oscurecimiento del tejido vascular es también un síntoma característico de la marchitez por *F. oxysporum*.

Los patógenos tienen una capacidad limitada para invadir tejidos vivos de la planta. Pueden crecer en las condiciones pobres de nutrientes de los vasos conductores de agua, pero sólo invaden el resto de la planta cuando ésta se debilita o muere por el estrés hídrico. Por otro lado, el bloqueo del xilema no está causado necesariamente por los propios patógenos, sino que a menudo es parte de la reacción de la planta contra la invasión. En particular, se produce una rápida acumulación de geles

vasculares pécticos que se impregnan de materiales fenólicos oxidados, aparentemente en un intento de contener la proliferación del hongo; La planta también produce unas estructuras globosas denominadas tilosas, supuestamente con el mismo fin. Si la infección inicial no es muy grave y la planta responde rápidamente, se puede localizar la enfermedad en unos cuantos vasos infectados. En cambio, si la infección inicial es grave y la respuesta de la planta es lenta, ésta muere; En este caso, el hongo crece desde el xilema hacia los tejidos parenquimáticos carnosos adyacentes y produce muchas clamidosporas por deposición de una pared gruesa y melanizada alrededor de cada compartimiento hifal individual (Agrios, 1997).

Algunos de los síntomas, como el amarilleo de las hojas o la pérdida de control de la función de los estomas, pueden estar causados por toxinas producidas por el patógeno. Se piensa que algunas de las toxinas producidas por el hongo en cultivo axénico pueden tener poca relevancia en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, en plantas enfermas se han encontrado otras en unos niveles que podrían explicar algunos de los síntomas, como por ejemplo el ácido fusárico (Beckman, 1987).

En general, el control de enfermedades en plantas se puede realizar mediante métodos físicos, como la esterilización de semillas o la rotación de cultivos; químicos, como los tratamientos con fungicidas o con compuestos activadores de la respuesta sistémica adquirida; y biológicos, como el empleo de bacterias y hongos antagonistas o la protección cruzada con aislados no patógenos o avirulentos. Los métodos físicos son económicos e inoocuos para el ambiente pero su eficacia es muy limitada debido a la amplia distribución y persistencia del hongo en el suelo. En cambio, los tratamientos químicos son altamente efectivos pero económicamente costosos. Los conocimientos sobre el control biológico de *Fusarium* se limitan a estudios específicos de campo, donde se estudia la producción de compuestos, generalmente por especies bacterianas, y su efecto en la patogénesis de *Fusarium* (Olivain *et al.*, 2003). El estudio genético de esta especie es relativamente reciente debido a que presenta limitaciones tales como una considerable variabilidad genética, reproducción asexual o gran variación morfológica que dificulta su

reconocimiento; por todo ello, los factores que determinan su patogenicidad son aún desconocidos (Roncero *et al.*, 2003). En la actualidad, el uso de cultivares resistentes es la única medida efectiva y económicamente rentable para controlar la enfermedad 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 deben practicar otras medidas de control (Prados-Rosales, 2008).

1.3. Mecanismos de infección

Los hongos han desarrollado numerosas estrategias con el fin de penetrar en la planta, invadir sus tejidos, crecer y propagarse en su interior. A diferencia de bacterias y virus, los hongos fitopatógenos son capaces de atravesar activamente las barreras vegetales externas. Los hongos patógenos que penetran en la planta por cualquier zona aérea se encuentran con la cutícula de cutina, superándola mediante estructuras de infección especializadas, como apresorios o tubos de penetración, o eliminándola localmente mediante la acción enzimática de las cutinasas. En cambio, la penetración a través de la raíz, carente de cutina, requiere la participación de celulasas que degraden la zona epidérmica. Una vez superada esta zona es necesario atravesar la pared celular primaria. 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).

Después de la penetración, el paso siguiente es la colonización de la planta, que habitualmente, es en esta fase donde tiene lugar la secreción de toxinas y/o compuestos análogos de hormonas vegetales, alterando la fisiología de la planta en beneficio del patógeno. También se ha descrito la producción, por parte del patógeno, de sustancias supresoras capaces de anular o disminuir la respuesta de defensa de la planta (Agrios, 1997).

Diversos hongos fitopatógenos no sólo producen potentes toxinas contra sus hospedadores, sino que también son capaces de secretar enzimas que detoxifican las toxinas vegetales. La tomatinasa es una de estas enzimas, y ha sido bien caracterizada en *F. oxysporum* (Roldan-Arjona *et al.*, 1999; Pareja-Jaime *et al.*, 2008); Su acción no provoca únicamente la detoxificación de la α -tomatina, una saponina, sino que el producto de su hidrólisis suprime en la planta las respuestas de defensa inducidas al interferir con los procesos de transducción de señales fundamentales para la resistencia a la enfermedad (Bouarab *et al.*, 2002).

1.4. Mecanismos de defensa de la planta

Aunque el gran número de microorganismos que son potencialmente capaces de causar enfermedades, las plantas son resistentes a la mayoría de los patógenos. Los mecanismos de defensa son diversos y abarcan desde la protección no específica y pasiva que confieren barreras preformadas, como la cutícula o la pared celular, hasta respuestas activas y altamente específicas propias del hospedador o de un cultivo determinado. En general, las plantas hacen frente a los patógenos con dos tipos de defensas: Estructurales, que actúan como barrera física limitando la entrada e invasión por parte del patógeno; y bioquímicas, donde una serie de reacciones dirigidas a la producción de sustancias tóxicas para el patógeno inhiben o limitan su crecimiento en la planta. Por ende, la superficie de la planta constituye la primera línea de defensa frente al patógeno. La pared celular vegetal es una estructura dinámica y altamente organizada, compuesta fundamentalmente por polisacáridos y, en menor medida, por proteínas; Encontramos proteínas estructurales, como extensinas, lectinas y proteínas ricas en prolina y glicina, así como numerosas clases de enzimas. Por otro lado, las plantas producen constitutivamente un gran número de compuestos con actividad antimicrobiana, como son los compuestos fenólicos, glicosídicos, lactonas insaturadas, compuestos azufrados, saponinas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, dienos, entre otros (Prusky y Keen, 1993).

La respuesta hipersensible (HR) es la más característica y efectiva de las defensas bioquímicas inducidas tras el reconocimiento del patógeno. Este mecanismo supone la muerte rápida de las células de la planta en la zona de la infección, formándose áreas necróticas donde el patógeno queda confinado. La generación de especies reactivas de oxígeno y la activación transcripcional de sistemas de defensa de la planta desembocan en la muerte celular en el sitio de infección, la acumulación local de fitoalexinas y el aumento de la rigidez de la pared celular como resultado de la deposición de callosa, lignina y suberina (Bolwell *et al.*, 2002). Además, se producen proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que no sólo se acumulan donde ocurre la infección, sino que se inducen a nivel sistémico, asociadas con el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (SAR) contra posteriores infecciones por hongos, bacterias o virus.

1.5. Reconocimiento 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 el fracaso de la infección (Callow, 1987). La detección del patógeno es el primer paso para que la planta responda y evite la infección y los daños causados por el mismo. Habitualmente, las plantas responden al ataque por patógenos a través de su sistema inmune, formado por dos ramas: La primera, reconoce y responde a moléculas comunes a todos los microbios, incluidos los no patógenos; La segunda, responde a los factores de virulencia más específicos de una forma directa o a través de efectores (Jones y Dangl, 2006).

Las especies vegetales son organismos no hospedadores para la mayoría de los patógenos, por lo que se les puede considerar resistentes a los mismos; ésta es la llamada resistencia general. Los patógenos vegetales producen diversas señales que potencialmente pueden ser detectadas por la planta; es el caso de algunos polisacáridos y glicoproteínas presentes en las

paredes fúngicas que advierten a la planta de la presencia del patógeno. Sin embargo, la planta puede no reconocer como extraño al patógeno, que en ese caso sería capaz de esquivar el reconocimiento general. La especie vegetal se convierte entonces en hospedadora para ese patógeno en particular, estableciéndose entre ellos una compatibilidad básica y teniendo lugar una interacción compatible. En *F. oxysporum* la compatibilidad básica se establece a nivel de razas fisiológicas, avirulentas o virulentas; y cultivares, resistentes o sensibles. El concepto de virulencia, por tanto, se refiere al hecho de que los aislados de una determinada raza fisiológica puedan provocar distintos grados de enfermedad sobre determinados cultivares idénticos.

En los años 50, a nivel molecular se propuso una hipótesis denominada “gen a gen” (Flor, 1947; Flor, 1971). Según esta hipótesis, para cada gen de avirulencia (*avr*) del patógeno existe en el hospedador el correspondiente gen que confiere resistencia (*R*). En general, la pérdida o mutación en un gen *avr* conlleva la desaparición de la resistencia mediada por el gen *R* correspondiente (Farman *et al.*, 2002).

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

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

La interacción *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-*Lycopersicon esculentum* cumple con el citado modelo “gen a gen”. En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se definen 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* protege contra la raza 2 y el *I-3* contra la raza 3. Por definición la raza 2 es virulenta en líneas *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 con la línea *I-3* y entre los

integrantes de estas razas pueden establecerse subgrupos en función de su virulencia en esta línea (Rep *et al.*, 2005).

F. oxysporum secreta una proteína, denominada Six1, durante la colonización del xilema que media la resistencia por el gen *I-3*. Las cepas afectadas en el gen *six1* son virulentas en plantas *I-3*, mientras que las que lo expresan correctamente no. Estos resultados indican que el reconocimiento y la resistencia de las plantas *I-3* hacia *F. oxysporum* está mediado por *six1* (Rep *et al.*, 2004).

1.6. Genes fúngicos importantes para la infección

En *F. oxysporum*, al igual que en otros hongos patógenos, se han empleado fundamentalmente dos aproximaciones experimentales para la identificación de genes esenciales en patogénesis (Di Pietro *et al.* 2003): la anulación dirigida de genes responsables de proteínas implicadas en funciones biológicas conocidas y que presumiblemente podrían resultar relevantes durante el proceso de infección; y alternativamente, la inserción al azar de fragmentos de ADN, por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Groot *et al.*, 1998) o mutagénesis al azar por inserción (son la integración de elementos genéticos móviles) (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001; López-Berges *et al.*, 2009) y la posterior identificación del gen interrumpido (Madrid *et al.*, 2003). No obstante la anulación dirigida de genes ha sido el método que ha generado mayor información. Entre ellos, se encuentra los genes caracterizados en *F. oxysporum*, que han mostrado ser necesarios en patogénesis (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de *F. oxysporum* que intervienen en patogénesis estudiados por interrupción.

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

Tabla 2. Continuación.

Gen	Anotación	Virulencia en planta	Referencia
<i>fga1</i>	Subunidad a de proteína G	reducida	Jain <i>et al.</i> , 2002
<i>fga2</i>	Subunidad a de proteína G	avirulento	Jain <i>et al.</i> , 2005
<i>fnr1</i>	Factor de transcripción	reducida	Divon <i>et al.</i> , 2006
<i>frp1</i>	Proteína F-box	avirulento	Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2006
<i>snf1</i>	Proteína quinasa	reducida	Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 2003
<i>cml1</i>	Carboxy-cis, cis-muconato ciclasa	avirulento	Michielse <i>et al.</i> , 2012
<i>pacC</i>	Factor de transcripción	muy virulento	Caracuel <i>et al.</i> , 2005
<i>arg1</i>	Argiinosucinato liasa	reducida	Namiki <i>et al.</i> , 2001
<i>cti6</i>	Factor de transcripción	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>dcw1</i>	Proteína de pared	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>fow1</i>	Transportador mitocondrial	reducida	Inoue <i>et al.</i> , 2002
<i>fow2</i>	Factor de transcripción	avirulento	Imazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>fpd1</i>	Proteína reguladora	reducida	Kawabe <i>et al.</i> , 2004
<i>ftf1</i>	Factor de transcripción	reducida	Ramos <i>et al.</i> , 2007
<i>pex12</i>	Peroxina	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>pex26</i>	Peroxina	reducida	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>sge1</i>	Factor de transcripción	avirulento	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>six1</i>	Proteína efectora	reducida	Rep <i>et al.</i> , 2005

1.7. *Fusarium* como patógeno oportunista de mamíferos

Los hongos son una clase muy versátil de microorganismos compuesta principalmente de saprófitos que prosperan en la materia orgánica muerta. Aproximadamente 10.000 especies de hongos infectan plantas (Agrios, 1997), mientras que alrededor de 400 han sido reportados como patógenos de mamíferos (De Hoog y Guarro, 1995), y un número limitado pueden causar la enfermedad en ambos tipos de hospedador. Este grupo de patógenos incluye a *F. oxysporum*, el principal causante de la marchitez vascular en más de un centenar de especies vegetales diferentes

(Armstrong y Armstrong, 1981). *F. oxysporum* se considera un patógeno oportunista capaz de producir infecciones en los seres humanos que varían de lo superficial o localmente invasivo hasta la fusariosis diseminada, dependiendo del estado inmunológico del individuo (Nucci y Anaissie, 2007).

La mayoría de las infecciones fúngicas oportunistas están relacionadas con especies como *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Penicillium marneffe*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii* y determinados serotipos de *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. 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. Generalmente la inmunosupresión suele producirse debido a terapias relacionadas con el tratamiento del cáncer o el trasplante de órganos y tejidos (Ortoneda *et al.*, 2004; Prados-Rosales *et al.*, 2006). Los aislados patogénicos de *F. oxysporum* en humanos tienen un origen polifilético y responden de forma pobre a los agentes antifúngicos disponibles (Azor *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2004).

Debido a la capacidad de *F. oxysporum* para infectar tanto plantas como mamíferos se ha propuesto esta especie como modelo universal para la disección genética de la virulencia fúngica en plantas y mamíferos. De hecho, una única cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, FGSC 9935, puede causar enfermedades en las plantas de tomate y los ratones inmunodeprimidos (Ortoneda *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la mayoría de los 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 en una misma cepa de dos factores de virulencia, no esenciales por sí solos, pueden hacerla avirulenta en ratones, como es el caso de los dobles mutantes $\Delta fmk1 \Delta fgb1$, que fueron incapaces de matar a ratones inmunodeprimidos (Prados-Rosales *et al.*, 2006). Estudios recientes de López-Berges *et al.* (2013), demostraron que los genes *VeA* y *LaeA* se

requieren para la virulencia total de *F. oxysporum* en plantas de tomate y en ratones inmunodeprimidos (López-Berges *et al.*, 2013).

La disponibilidad de herramientas moleculares como la anulación dirigida de genes (Di Pietro *et al.*, 2003) o mutagénesis al azar por inserción (López-Berges *et al.*, 2009; Michielse *et al.*, 2009), así como de la secuencia completa del genoma (Ma *et al.*, 2010) hacen de *F. oxysporum* un modelo único para el estudio de las bases genéticas de la patogenicidad inter-reino en hongos.

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

Mutantes	Fenotipo en planta	Fenotipo en ratón	Referencia
<i>ΔlaeA</i>	No virulento	No virulento	López-Berges <i>et al.</i> , 2012
<i>ΔpacC</i>	Virulento	No virulento	Caracuel <i>et al.</i> , 2003; Ortoneda <i>et al.</i> , 2004
<i>Δwvc1</i>	Virulento	No virulento	Ruiz-Roldán <i>et al.</i> , 2008
<i>ΔchsV</i>	No virulento	Virulento	Madrid <i>et al.</i> , 2003; Ortoneda <i>et al.</i> , 2004
<i>ΔhapX</i>	No virulento	No virulento	López-Berges <i>et al.</i> , 2012
<i>Δfmk1</i>	No virulento	Virulento	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001; Ortoneda <i>et al.</i> , 2004
<i>Δfgb1</i>	No virulento	No virulento	Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005; Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2006
<i>Δfmk1Δfgb1</i>	No virulento	No virulento	Delgado-Jarana <i>et al.</i> (2005)
<i>Δfpr1</i>	Virulento	No virulento	Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2012
<i>ΔveA</i>	No virulento	No virulento	López-Berges <i>et al.</i> , 2012
<i>Δabc3</i>	No virulento	Virulento	López-Berges <i>et al.</i> , 2012
<i>Δbeas</i>	No virulento	No virulento	López-Berges <i>et al.</i> , 2012
<i>Δrho1</i>	No virulento	Virulento	Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008
<i>Δgas1</i>	No virulento	Virulento	Caracuel <i>et al.</i> , 2005

2. La ruta TOR (Target Of Rapamycin)

En la década de los 70, a partir de una muestra de suelo de la isla chilena de Rapa Nui se aisló una cepa bacteriana de *Streptomyces hygroscopicus* que producía un metabolito antifúngico muy potente. Este metabolito que posteriormente fue nombrado rapamicina, es una lactona macrocíclica y altamente lipofílica con un anillo. La rapamicina inhibe la proliferación de células de mamíferos y posee propiedades inmunosupresoras. Estas observaciones condujeron a investigaciones más detalladas sobre el modo de acción de la rapamicina (Wullschleger *et al.*, 2006). La quinasa TOR fue originalmente identificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a través de las mutaciones *TOR1-1* y *TOR2-1*, que confieren resistencia a la rapamicina (Heitman *et al.*, 1991). Además este estudio demostró que la rapamicina requiere de un cofactor intracelular, la peptidil-prolil cis/trans isomerasa (FKBP12), para ejercer el efecto tóxico, pues forma un complejo con FKBP12 que se une a TOR, inhibiéndola. Posteriormente, estudios bioquímicos en células de mamíferos llevaron a la identificación y la clonación de mTOR (mammalian target of rapamycin, también conocida como FRAP, RAFT, RAPT, o SEP). Hasta el momento cada genoma eucariota analizado, incluyendo levaduras, algas, plantas, gusanos, moscas y mamíferos, contienen al menos una copia de TOR (Wullschleger *et al.*, 2006).

2.1. TOR es un regulador central del crecimiento celular

Target of rapamycin (TOR) es una serina/treonina quinasa altamente conservada que controla el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a nutrientes tales como aminoácidos, factores de crecimiento como la insulina y los niveles de energía celular (ATP). La quinasa TOR activa el crecimiento mediante la regulación positiva y negativa de procesos anabólicos y catabólicos, respectivamente, que colectivamente determinan la acumulación de masa celular. Los procesos anabólicos activados por TOR incluyen la transcripción, la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, el transporte de nutrientes y el metabolismo mitocondrial. Por el contrario, TOR

reprime los procesos catabólicos tal como la degradación de RNAm, la proteólisis dependiente de ubiquitina, la autofagia y la apoptosis. El descubrimiento de TOR supuso un cambio fundamental en nuestro concepto del crecimiento celular, indicando que no se trata de un proceso espontáneo que ocurre sólo cuando hay nutriente disponibles, sino que es un proceso altamente regulado por vías de señalización dependientes de TOR (Hall M. N., 2008).

La desregulación de TOR está asociada con muchas enfermedades humanas tal como la diabetes y el cáncer. Por ello TOR es una diana atractiva para numerosos tratamientos clínicos, particularmente en cáncer (Kim y Guan, 2011). Por su parte, existen casos donde la desregulación de TOR está asociada a infección y patogénesis virales, varias de ellas conocidas por su capacidad oncogénica, inducción de apoptosis, linfomas en pacientes recipientes de trasplantes e inmunosupresión en general (Krams y Martínez, 2008). Cuando las condiciones de crecimiento son favorables, TOR está activa y las células mantienen una tasa rápida de biogénesis de ribosomas, iniciación de la traducción e entrada de nutrientes. Sin embargo, las células de levadura tratadas con rapamicina, en hambre de nitrógeno, o agotados en TOR1 y TOR2 muestran una disminución dramática de la síntesis de proteínas, un aumento de la macroautofagia (secuestro al azar y entrega del citoplasma al lisosoma/vacuola), y una activación de varios factores de transcripción implicados en respuesta a estrés (Wullschleger *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han revelado mecanismos de regulación de TOR por factores de crecimiento y los niveles de energía celular, sin embargo, los conocimientos sobre la regulación de TOR por estrés celular y aminoácidos (AA) están aun incompletos. El primer indicio del papel de TOR en respuesta a nutrientes se obtuvo en estudios genéticos en *S. cerevisiae*. La inhibición de TOR con rapamicina o la delección de los genes TOR en células de levadura simula la detención del ciclo celular en G₀, inducida por falta de nutrientes o crecimiento en hambre de nitrógeno (Barbet *et al.*, 1996). Posteriormente, estudios genéticos en *Drosophila melanogaster* mostraron

que la pérdida de función de TOR inhibe el desarrollo larval y produce un fenotipo celular similar a los causados por carencia de aminoácidos (Oldham *et al.*, 2000 y Zhang *et al.*, 2000).

2.2. Mecanismos de regulación de la ruta TOR

La proteína quinasa TOR se encuentra en dos complejos multiproteicos funcional y estructuralmente distintos, denominados TORC1 y TORC2 (Figura 3), que se encuentran tanto en animales como en levaduras (Wullschleger *et al.*, 2006). Los componentes principales de TORC1 en levaduras son TOR (TOR1 o TOR2), KOG1 y LST8. TORC1 regula procesos celulares tal como la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la captación de nutrientes y la autofagia. En cambio, TORC2 contiene TOR2, AVO1, AVO2, AVO3 y LST8 y, regula la organización del citoesqueleto de actina, la supervivencia celular, la síntesis de lípidos además de otros procesos. TORC1 es sensible a la rapamicina, mientras TORC2 es insensible a la droga, aunque en algunos organismos, como *Arabidopsis thaliana* y *Trypanosoma brucei*, esta norma no es aplicable. No obstante, el tratamiento a largo plazo con rapamicina puede también inhibir a TORC2 en líneas celulares de mamíferos. Además, existen datos que indican que no todos los TORC1 son sensibles a rapamicina. En *S. cerevisiae* se conocen dos proteínas TOR codificadas por dos genes distintos, *TOR1* y *TOR2*. TOR1 sólo forma parte de TORC1 mientras *TOR2* se encuentra tanto en TORC1 como en TORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006).

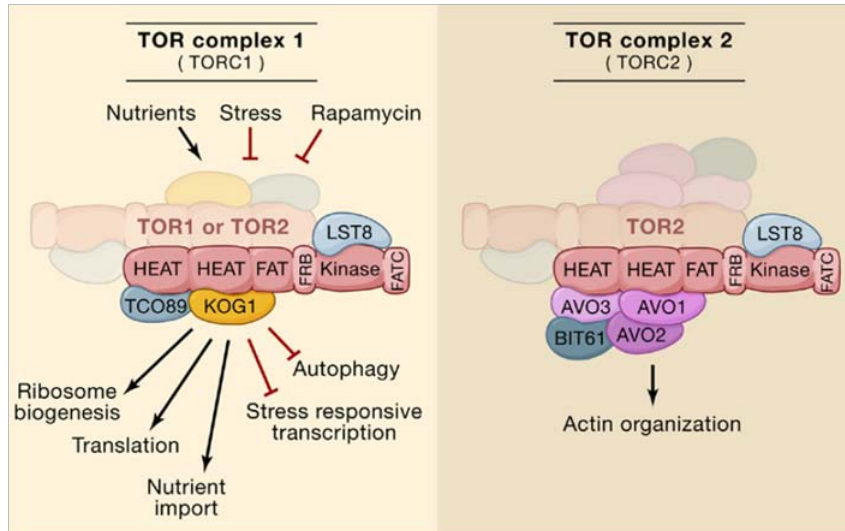


Figura 3. Complejos TOR1 (TORC1) y TOR2 (TORC2) en *S. cerevisiae*. Representación de las proteínas asociadas a TOR (KOG1, TCO89, LST8, AVO1-3 y BIT61) y los dominios presentes en TOR (HEAT, FAT, FRB, Quinasa y FATC). Tanto TORC1 como TORC2 son multímeros, probablemente dímeros. TORC1 es sensible a rapamicina y media señales de crecimiento y la acumulación de masa. TORC2 es insensible a la rapamicina y es necesario para la organización del citoesqueleto de actina (Wullschleger *et al.*, 2006).

La mayoría de los hongos filamentosos y animales, contienen solo un homólogo de *TOR*. Hasta el momento se sabe poco sobre las funciones de TOR en hongos filamentosos. La actividad antifúngica de la rapamicina contra los hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *Penicillium spp.* o *Podospora anserina* sugiere funciones para TOR en el crecimiento celular, similar a *S. cerevisiae* y humano. Recientemente, cinco genes que codifican componentes posibles de la vía TOR han sido identificados en el genoma de *A. nidulans*: *torA*, *fprA*, *jipA*, *sitA* y *tapA* (Fitzgibbon *et al.*, 2005). En el hongo filamentosos *F. fujikuroi*, TOR está involucrado en la regulación del metabolismo secundario por el nitrógeno, y la rapamicina afecta la expresión de genes implicados en el control de la traducción, la biogénesis de ribosomas, el metabolismo del carbono y la autofagia (Teichert *et al.*, 2006). Hasta el momento el papel de la quinasa TOR en la virulencia de hongos patógenos de plantas no ha sido examinado.

Estudios previos demostraron que la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) Fmk1 es esencial para la patogénesis en plantas de tomate y controla procesos relacionados con la virulencia, como el crecimiento invasivo en tejido vegetal vivo, la adhesión a la raíz, la fusión vegetativa de hifas o la penetración del celofán (Di Pietro *et al.*, 2001, Prados Rosales y Di Pietro 2008). En trabajos recientes se ha demostrado que la fuente de nitrógeno regula los mecanismos de virulencia, los cuales son reprimidos específicamente por amonio, pero no por otras fuentes como el nitrato o el glutamato. Cabe destacar que la represión por amonio es anulada en presencia de rapamicina, un inhibidor específico de la proteína quinasa TOR (de las siglas en inglés por Target Of Rapamycin). Estos resultados sugieren que existe una conexión entre la vía de señalización TOR y las funciones de virulencia en *F. oxysporum* (López-Berges *et al.*, 2010). En el presente trabajo hemos estudiado determinados componentes que participan en los mecanismos de regulación y la activación de la vía de señalización de la quinasa TOR.

OBJETIVOS

1. Poner a punto el uso de *G. mellonella* como modelo alternativo al ratón para el estudio de los mecanismos de virulencia de *F. oxysporum* en animales.
2. Identificar y caracterizar distintos componentes de la cascada TOR en *F. oxysporum* y estudiar el papel de dicha ruta en el desarrollo y la virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Las estirpes bacterianas y fúngicas y el material vegetal y animal utilizado en este trabajo se describen en las siguientes tablas.

Tabla 4. Cepa bacteriana *Escherichia coli*

Especie	Estirpe/Cultivar	Características genéticas
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15) ¹ , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> . Receptora en experimentos de transformación genética para amplificación de plásmidos, PCR y secuenciación de ADN.

¹La mutación Φ 80/*lacZ* Δ M15 permite la α -complementación con el extremo amino-terminal de la β -galactosidasa, codificado en los vectores pUC y en los derivados del mismo. Sensible al antibiótico ampicilina. Cepa receptora utilizada en los experimentos de transformación genética de bacterias y para amplificar y aislar ADN plasmídico.

Tabla 5. Cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizadas en el presente trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
4287 (FGSC 9935)	Estirpe silvestre (f. sp. <i>lycopersici</i> , raza 2)	FGSC ²
Δ <i>rim15</i>	<i>rim15::HYG</i>	Presente trabajo
Δ <i>tsc2</i>	<i>tsc2::HYG</i>	Presente trabajo
Δ <i>tsc2+tsc2</i>	<i>tsc2::HYG</i> ; <i>tsc2</i> , PHLEO	Presente trabajo
Δ <i>slc1a5</i>	<i>slc1a5::HYG</i>	Presente trabajo
Δ <i>slc7a5</i>	<i>slc7a5::HYG</i>	Presente trabajo
<i>gtr1</i> ^{Q86L}	<i>gtr1</i> ^{Q86L} ::PHLEO	Presente trabajo
<i>gtr1</i> ^{Q86L} Δ <i>tsc2</i>	<i>gtr1</i> ^{Q86L} ::PHLEO; <i>tsc2::HYG</i>	Presente trabajo
Δ <i>sch9</i>	<i>Sch9::HYG</i>	Aguilar-Pontes <i>et al.</i> , sin publicar
Δ <i>sch9</i> Δ <i>tsc2</i>	<i>tsc2::HYG</i> ; <i>sch9::PHLEO</i>	Presente trabajo
Δ <i>fmk1</i>	<i>fmk1::PHLEO</i>	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
Δ <i>meaB</i>	<i>meaB::HYG</i>	(López-Berges <i>et al.</i> , 2009)

⁽²⁾*Fusarium Genetics Stock Center*

Tabla 6. Material vegetal utilizado en este estudio

Especies	Cultivar	Especificaciones
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Monika ³	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Money Maker	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Manzana (<i>Malus pumila</i> Mil.)	Golden delicious	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

³Cedida por Syngenta Seeds, Almería

Tabla 7. Material animal utilizado en este estudio

Especies	Origen	Especificaciones
Polilla de la cera (<i>Galleria mellonella</i>)	Animal Center S. A., Valencia	Estadio larval final, peso entre 0,1-0,2 g

2. Medios de cultivo

Los medios se esterilizaron usando un autoclave a 120 °C y 1,2 atmósfera de presión durante 20 minutos, o mediante filtración (*Millipore* con diámetro de poro de 0.22 µm). Los medios sólidos fueron fundidos y repartidos en placas Petri antes de su solidificación.

2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

- **Medio Luria-Bertani:**

Líquido (LB): bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (5 g/l).

Sólido (LA): medio líquido LB suplementado con 15 g/l de bactoagar.

- **Medio sulfato-maltosa (SM):**

Medio de cultivo LB o LA suplementado con 1 mM de MgSO₄ y 0.2% de maltosa (p/v).

- **Medio LA-XGal-Ampicilina-IPTG:**

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

2.2 Medios de cultivo para *F. oxysporum*

- **Medio nutritivo:**

PDB líquido: (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. Esterilizar en autoclave. Cuando sea necesario, añadir higromicina B (20 µg/ml) o fleomicina (2 µg/ml) al medio atemperado.

PDA sólido: (Potato Dextrose Agar): 3.9% agar de patata y dextrosa (p/v) (Scharlau Microbiology). Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 mg/ml en PDB y 55 mg/ml en PDA) o fleomicina (1.6 µg/ml en PDB y 4 µg/ml en PDA).

- **Medio rico YPG (Yeast extract Peptone Glucose):**

Extracto de levadura (3 g/l), peptona (10 g/l) y glucosa (20 g/l). Añadir 15 g/l de bactoagar para medio sólido.

- **Medio mínimo de regeneración:**

MgSO₄ · 7H₂O (0,5 g/l); KH₂PO₄ (1 g/l); KCl (0,5 g/l); NaNO₃ (2 g/l); glucosa (20 g/l); sacarosa (200 g/l) y agar oxoid (12,5 g/l para las cajas y 4 g/l para la cobertera). Para seleccionar resistentes a fleomicina es necesario ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N después de la esterilización.

- **Medio mínimo Puhalla (Puhalla, 1968):**

MgSO₄ · 7H₂O (0,5 g/l); KH₂PO₄ (1 g/l); KCl (0,5 g/l); NaNO₃ (2 g/l) y sacarosa (30 g/l). Añadir 20 g/l de agar (Oxoid) para medio sólido. Después de esterilizar en autoclave se le añadieron 200µl/l de la siguiente disolución de elementos traza⁽¹⁾, esterilizada por filtración.

⁽¹⁾Elementos traza: Ácido cítrico (0.05 g/l); ZnSO₄ (0,05 g/l); FeSO₄ · 7H₂O (0,048 g/l); Fe(NH₄)SO₄ · 6H₂O (0,01 g/l); CuSO₄ · 5H₂O (0,0025 g/l); MnSO₄ · H₂O (0,0005 g/l); HBO₃ (0,0005 g/l); Na₂MoO₄ · 2H₂O (0,0005 g/l).

Este mismo medio fué utilizado sustituyendo el NaNO_3 por distintas fuentes de nitrógeno y de aminoácidos, en función del experimento.

- **Medio mínimo Puhalla (Puhalla, 1968) con membranas de celofán:**

Se recortan membranas de celofán con el molde de una placa de Petri y se esterilizan en autoclave introducidas en agua desionizada. Posteriormente, se colocan sobre placas de medio mínimo Puhalla con unas pinzas estériles y se dejan secar durante 5 min en la campana de flujo laminar vertical.

3. Compuestos químicos

Para llevar a cabo distintos ensayos de sensibilidad o realizar tinciones con blanco de calcoflúor (CFW) se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 8. Compuestos químicos utilizados

Compuesto/Fuente	Preparación	Almacenamiento
Rapamicina (Rapa); Sigma	0.1% (p/v) en DMSO	-20 °C en oscuridad
Rojo Congo (CR); Sigma	1% (p/v) en agua	-20 °C en oscuridad
Blanco de calcoflúor (CFW); Sigma	1% (p/v) con 0,5% (p/v) KOH y 83% glicerol (v/v)	-20 °C en oscuridad
Menadiona (MD); Sigma	1,6% (p/v) en etanol	-20 °C en oscuridad
Dodecil sulfato de sodio (SDS); Fluka	10% (p/v) en agua	Temperatura ambiente

4. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación, secuenciación y extensión se diseñaron con la ayuda del programa Oligo (versión 6.65; Molecular Biology Insights, Inc. USA), analizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillas, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m , T_d , %G+C, %A+T). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por diversas casas comerciales (MWG-Biotech y Bonsai Technologies). Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Oligonucleótidos sintéticos empleados en este estudio.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nombre	Secuencia (5'-3')
M13-for	CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC	tsc2-1f	GTGGCTGCTCTTGTTGACCT
M13-rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	tsc2-2r	ATCCCACGAACAGCAGCATAC
act-2	GAGGGACCGCTCTCGTCGT	tsc2-1n	AAATCGTGTGTCTGCTTCTGG
act-6q	GGAGATCCAGACTGCCGCTCAG	tsc2-2n	GGGTATTGCCAACAAAGTCTC
hph-6	TCGTTATGTTTATCGGCACTTT	tsc2-hyg-1	GTGACTGGGAAAACCTGGCGACCAACACA TCCGTCTCTCAG
hph-12	TTCGGGGACGTCCTCGGC	tsc2-hyg-2	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTAGAAGGA AGGAGTTACATTAGCAA
hyg-Y	GGATGCTCCGCTCGAAGTA	tsc2-comp	CACACACACACGCACACATAC
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	tsc2-RT1	AGAGACGCCATCCCCAGATT
gpdA-9	GTGATGCTGCTCAAGCGG	tsc2-RT2	GTTGCCCGTTGAGGTTGCTG
phl	AGTTGACCAGTGCCGTCCG	gtr1-1f	TACCGCTTTTACCCTTCAGTTTC
leo	GCCACGAAAGTGCACGCAGTT	gtr1-2r	ACTGGACAGACACTCGCGCG
rim15-1f	GAAACGCCAAAACAAACAC	gtr1-fnest	CCTCCGCCACTCATCTATC
rim15-2r	CTTCCACTCCGTAGCCTGTAA	gtr1-rnest	GCATTCTGATCCTCTCGGC
rim15-1n	AAACCAACACCCACCCACA	gtr1 ^{S41N} -3f	CTCCGGCAAGAAGCAGCATGAGGA
rim15-2n	TCTCAACTTCTCAACCCCTC	gtr1 ^{S41N} -4r	TCCTCATGCTGTTCTTGCCGGAG
rim15-hyg-1	GTGACTGGGAAAACCTGGCGACTGAC GTGCAACAGAA	gtr1 ^{ORBL} -5f	TGCGGTGGCTAGAGGCCTTTA
rim15-hyg-2	TCCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTAATTC ATACAGGCTCGGTGC	gtr1 ^{ORBL} -6r	TAAAGGCCTTAGACCACCGCA
slc1a5-1f	CTTCTATTCTCCGTCGCT	gtr1 ^{S41N} -for	AAGCCCCAAAGCCCAAGCG
slc1a5-2r	GTATCGGTTATCGCTGAGTAGT	gtr1for-sonda	AAGCCCCAAGAAGAAAAGGTGC
slc1a5-1n	TCCTATCGTGGTGCTCTTG	gtr1rev-sonda	TTTGCGCGGGGGAGATTG
slc1a5-2n	CGCTGAGTAGTGTGTATAGT	Gapdh-F	TGATGTTGAACCTGCTCGCAG
slc1a5-hyg-1	GTGACTGGGAAAACCTGGCGAAGAGAGG ACCGTGAAGTAGC	Gapdh-R	CCAAAAACAGTAAACAGCCTTC
slc1a5-hyg-2	TCCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTAGTTGGA CGCTGATGTGTGAGT	six1-1	ATAGCATGGTACTCCTTGCGG
slc7a5-1f	CAAACAACCTCCGTCATCC	six1-2	CCTGATGGTGACGGTTACGAA
slc7a5-2r	GTATCGGTTATCGCTGAGTAGT	GallFor	AGATCGCTTTATAGTCGCAATA
slc7a5-1n	TCCTATCGTGGTGCTCTTG	Gallrev	CTCTCTCCAACCTTACCTACT
slc7a5-2n	CGCTGAGTAGTGTGTATAGT		
slc7a5-hyg-1	GTGACTGGGAAAACCTGGCGAGTATGTGT AGTTGCTCTTCC		
slc7a5-hyg-2	TCCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTACTGCTT GGCTCATTTTGGCG		

5. Vectores de clonación

Los vectores de clonación utilizados se detallan a continuación:

Tabla 10. Vectores utilizados en este trabajo

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

6. Programas para el análisis de datos

Para el procesado y manejo de los datos obtenidos durante este trabajo, se utilizaron los siguientes programas informáticos:

Tabla 11. Programa para el análisis de datos

Programa		Aplicación
BLAST (NCBI)	Blastn (estándar)	Búsqueda de secuencias nucleotídicas similares a la problema
	Blastp (estándar)	Búsqueda de proteínas similares a la proteína en estudio
	Blastx (traducido)	Búsqueda de secuencias de proteínas similares a la traducción de la secuencia nucleotídica en estudio
	tBlastn (traducido)	Búsqueda de secuencias de nucleotídicas que codifican secuencias aminoacídicas similares a la problema
LaserGene (DNA-Star)	EditSeq	Edición de secuencias
	SeqBuilder	Análisis de la ORF y de sitios de enzimas de restricción
	MegAlign	Alineamiento de secuencias
	SeqMan	Gestión de secuencias para su ensamblaje
Bioedit		Edición y alineamientos de secuencias
Oligo 6		Diseño de oligonucleótidos sintéticos
KODAK 1D Image Análisis		Captura, edición y análisis de imágenes obtenidas de geles de ADN y ARN
Leica IM 500 y Leica QWin		Edición y análisis de imágenes obtenidas con el microscopio óptico y lupa estereoscopio
FUJIFILM Image Reader		Captura, edición y análisis de imágenes de quimioluminiscente
Epson Scan		Escaneo de imágenes
Bio-Rad IQ5		Obtención y análisis de datos de RT-PCR a tiempo real
Microsoft Office	Word	Procesamiento se texto
	PowerPoint	Presentación y tratamientos de imágenes
	Excel	Procesamiento de datos
EndNote		Editor de referencia y bibliografía
GraphPad Prism3		Procesamiento de datos
Adobe Photoshop Elements		Procesamiento de imágenes
SPSS 15.0 para Windows		Análisis estadístico

7. Crecimiento y mantenimiento de organismos

7.1. Bacterias

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron a 37°C, con agitación (250 rpm) si se trata de medio líquido LB, y en estufas si eran placas de

medio sólido. La conservación de estirpes bacterianas durante períodos largos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio LB con 30% glicerol (v/v). Para períodos cortos, se mantuvieron en medio LB sólido a 4°C, con el antibiótico de selección para estirpes portadoras de plásmidos con algún gen de resistencia.

7.2. *Fusarium oxysporum*

Los cultivos de hongos de *F. oxysporum* se incubaron a 28°C. Si el medio era líquido, la incubación se realizó con agitación orbital (170 rpm). Para la conservación de las distintas estirpes, se recogieron las esporas de un cultivo de 3-4 días en medio PDB. Para ello, el cultivo se filtró a través de un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) para eliminar el micelio, y el filtrado se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. A continuación se lavó el precipitado de esporas con agua destilada estéril y se almacenó a -80 °C con 30% glicerol (v/v). Estas suspensiones de esporas se emplearon como inóculo para la obtención de esporas frescas.

7.3 Plantas

Para obtener las plántulas de tomate se esterilizaron las semillas sumergiéndolas en 20% lejía (v/v) durante 20 minutos seguidos de 3 lavados con abundante agua durante 10 minutos cada vez. Una vez sembradas en vermiculita humedecida, se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y humedad controlada) a una temperatura de 28 °C. Los ensayos de infección se realizaron con plantas de 2-3 semanas, cuando ya habían aparecido las primeras hojas verdaderas.

7.4 *Galleria mellonella*

Las larvas de *G. mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae: Polilla de cera) en el estadio larval final, fueron suministradas por Animal Center S. A., Valencia, España (forman parte de la dieta de algunos anfibios, reptiles y aves). Las larvas se colocaron en cajas con dieta artificial estéril, manteniéndolas en condiciones de temperatura y humedad adecuada. La dieta artificial para larvas fue elaborada en el laboratorio, la cual consistió en mezclar germen de trigo (15,4%), levadura (5,4%), leche en polvo (10,55%), harina de maíz (15,4%), salvado de trigo fino (15,4%), glicerina (5,4%) y miel (24,3%), y una vez mezclados los productos sólidos se le añadió la miel y la glicerina quedando una masa suelta y homogénea.

8. Aislamiento de ácidos nucleicos

8.1. Purificación de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala con CTAB (minipreps)

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson (1980), con algunas modificaciones. Se partió de un cultivo de 12-14 horas en 5 ml de medio de selección obtenido a partir del inóculo de una única colonia de la estirpe portadora del plásmido de interés. Tras centrifugar 3 ml del cultivo durante 2 minutos a 13400 rpm y retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 200 μ l de STET (8 % sacarosa (p/v); 0,1% Tritón X-100 (v/v); 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). A continuación se añadieron 4 μ l de lisozima (50 mg \cdot ml⁻¹) para provocar la lisis celular y 4 μ l de ribonucleasa A (RNasa) (10 mg \cdot ml⁻¹) para eliminar el ARN contaminante y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente la muestra se calentó a 100 °C durante 45 segundos y, tras centrifugar durante 10 minutos a 13400 rpm, se retiraron los restos celulares, de aspecto mucoso, con un palillo de dientes esterilizado. Se añadieron 10 μ l de CTAB (5% bromuro de hexadeciltrimetilamonio p/v que se mantuvieron a 37 °C para evitar que precipite) al sobrenadante, para precipitar el ADN, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 13400 rpm y se retiró el

sobrenadante. A continuación, se añadieron 350 μl de una solución de 1,2 M NaCl y 750 μl de etanol puro frío. Se homogeneizó bien y se centrifugó durante 10 minutos a 13400 rpm. El precipitado se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 20 μl de agua desionizada estéril. Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 0.7% agarosa (p/v).

8.2. Extracción de ADN genómico de *F. oxysporum*

La purificación de ADN se realizó a partir de micelio de un cultivo del hongo de 3-4 días, recogido por filtración a través de filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 μm). Una vez que el micelio se secó con papel de filtro, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Se siguió el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con algunas modificaciones. 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 ácido ($12,1\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); EDTA ($7,44\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); NaCl ($81,8\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($20\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) se disuelven y calientan a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, ajustando a un pH 8,0 con NaOH en lentejas.; luego se lleva a 100 ml y se esteriliza por autoclave y se almacena a 37°C para evitar que precipite). Se homogeneizó vigorosamente, se añadieron 4 μl de β -mercaptoetanol (Merck) y 500 μl de una solución cloroformo: octanol (24:1, v/v), y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Al sobrenadante se le añadió 1 ml de 100% etanol frío y se mantuvo a -20°C durante 10 minutos. Después se centrifugó durante 5 minutos a 7500 g, se lavó sucesivamente con 1 ml de una solución 200 mM de acetato sódico en 75% etanol (v/v) y 1 ml de una solución 10 mM de acetato sódico en 75% etanol (v/v). Finalmente, se resuspendió en 50 μl de agua desionizada estéril y se añadieron 4 μl de ARNasa ($10\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), y se incubó a 37°C durante

30 minutos. Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 0.7% agarosa (p/v).

8.3. Extracción de ADN genómico de tallos y raíces de plantas infectadas

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de raíces y tallos de 3 plantas infectadas a los 5 y 10 días después de la inoculación con las distintas cepas de *F. oxysporum*. Se lavaron las muestras con agua para limpiarlas de la vermiculita, secadas cuidadosamente y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para guardarlas a -80 °C hasta su utilización. Con la ayuda de un mortero, se pulverizaron las muestras separadamente en nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de tampón de extracción CTAB. Se utilizó el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con algunas modificaciones.

8.4. Extracción de ADN genómico de larvas de *G. mellonella* infectadas

Para la extracción de ADN genómico, se recogieron tres larvas infectadas por cada tratamiento a los 2 días después de la inoculación con las distintas cepas de *F. oxysporum*. Se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para guardarlas a -80 °C hasta su utilización. Con la ayuda de un mortero, se pulverizaron las muestras separadamente en nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de tampón de extracción CTAB. Se utilizó el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con algunas modificaciones.

8.5. Extracción de ARN total de *F. oxysporum*

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas para cada experimento. Para obtener dicho micelio, se partió de microconidios frescos obtenidos de un cultivo líquido de 3-4 días en medio PDB, se reinocularon 2.5×10^6 microconidios en 25 ml del mismo medio y se incubaron a 28 °C durante 12 horas con 170 rpm de agitación. Pasado este tiempo, las germínulas se obtuvieron por filtración a través de filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 μm), se recogió con una espátula esterilizada, se secó bien con papel de filtro y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido almacenándolo después a -80 °C hasta su uso.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron 50 mg de micelio en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero, y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de *Tripure Isolation Reagent* (Roche). Se homogenizó vigorosamente y se centrifugó a 4 °C, durante 10 minutos y 12000 g. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 4 °C durante 5 minutos, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 μl de cloroformo y se homogenizó vigorosamente durante 15 segundos. Posteriormente, se incubó a 4 °C durante 15 minutos. Después de centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 12000 g, la solución se separó en tres fases. La fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un vial limpio, al que se le añadieron 500 μl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos y 12000 g, para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de 75% etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos y a 7500 g, se secó, se resuspendió en 50 μl de agua libre de ARNasas y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 minutos para facilitar la disolución del ARN. Por último, cada muestra se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 1% agarosa (p/v).

9. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

9.1 Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por las casas comerciales Roche y Fermentas. Los tratamientos del ADN con una única enzima de restricción o con enzimas que actúan en el mismo tampón se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se utilizaron 1-2 Unidad 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 genómico (ADNg) para análisis *Southern*, se digirieron 10 μg de ADN con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima durante no más de 3 horas.

En los tratamientos con dos enzimas que no actúan en el mismo tampón, se añadió primero la enzima cuyo tampón contenía menor concentración salina, y se dejó actuar al menos 1 hora. A continuación, se añadieron las sales necesarias para el funcionamiento óptimo de la segunda, así como la propia endonucleasa, y se prolongó la incubación durante otros 60 minutos a su temperatura óptima de reacción. Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico a 65°C durante 15 minutos.

9.2. Defosforilación

La defosforilación de plásmidos linearizados antes de su unión con el inserto correspondiente disminuye drásticamente la frecuencia de reacciones intramoleculares y, por tanto, el número de plásmidos sin inserto que se obtienen después de la ligación. Para la reacción de defosforilación, se empleó 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.

9.3. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de fragmentos de ADN a vectores linearizados se llevó a cabo utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (Roche), según las indicaciones del fabricante.

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR se empleó el sistema pGEM®-T Vector System (Promega) o el kit *pSpark® I DNA cloning system* (Canvax), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una relación 3:1 (inserto:vector). Antes de su unión, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit comercial GENE CLEAN® Turbo Nucleic Acid Purification Kit (Bio-101), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

10. Electroforesis de ácidos nucleicos

10.1. Geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa ("Agarose SPI", Duchefa) disuelta en tampón TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA pH 8,0). La concentración de agarosa varió, entre 0,7-2% (p/v), en función del tamaño de los fragmentos a separar. Para poder visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa (0,25% azul de bromofenol (p/v); 0,25% azul de xilencianol (p/v); 40% sacarosa (p/v) en 5X TAE) en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de $1-4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak modelo DC290 con filtro Wratten 22A. La iluminación inferior procedía de un transiluminador de luz ultravioleta modelo TCX (Vilber Lourmat).

Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se incluyó rutinariamente ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (fragmentos de 0,2 a 23,1 kb; Invitrogen); 100 bp ladder de Biotools (fragmentos de 80 a 1031 pb); DNA ladder 100-2000 pb de MBL (fragmentos de 100 a 2000 pb) o DNA ladder 500-10000 pb de MBL (fragmentos de 500 pb a 10 kb).

10.2. Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó usando el kit comercial GENE CLEAN® Turbo Nucleic Acid Purification Kit (Bio-101), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las disoluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y pH adecuados para la unión del ADN a una membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

11. Cuantificación de ácidos nucleicos

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

12. Hibridación y detección de ácidos nucleicos

12.1. Transferencia de ADN en gel de agarosa para análisis Southern

Después del tratamiento con las endonucleasas de restricción y la electroforesis, se fotografió el gel y se trató para hacer posible la desnaturalización del ADN y su posterior hibridación. Los tratamientos del gel se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con agitación suave y por duplicado.

Primero se sometió el ADN a una depurinización ácida (hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en una solución 0,25 N HCl durante 15 minutos. A continuación se realizó una desnaturalización alcalina con una solución 0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl, durante 15 minutos. Finalmente se neutralizó el ADN sumergiendo el gel en una solución 0,5 M Tris pH 7.5:1.5 M NaCl.

A continuación el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche). La transferencia se llevó a cabo en una bandeja conteniendo tampón 10x SSC (1,5 M NaCl y 0,15 M citrato sódico pH 7,0) en la que se colocaron, por orden:

- una bandeja de electroforesis invertida;
- 4 piezas de papel de filtro del tamaño del gel empapadas en la solución 10x SSC. Estas piezas deben quedar en contacto con la solución de la bandeja;
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, humedecidas en 10x SSC; el gel de agarosa;
- la membrana de nailon, humedecida en 3x SSC;
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, empapadas en 3x SSC;
- 3 piezas de papel Whatman 3MM, secos;
- una pila de unos 10 cm de servilletas de papel;
- una placa de cristal y un peso de 0.5 kg.

Todo ello se dispuso con cuidado de eliminar las posibles burbujas de aire que pudieran quedar entre el papel Whatman 3MM y el gel, o entre el gel y la membrana de nailon. La transferencia se prolongó durante al menos 12 horas a 4°C. Finalmente, la fijación del ADN a la membrana se realizó a 80°C durante 90 minutos.

12.2. Prehibridación

Para el análisis Southern, la membrana se incubó a 50°C durante al menos 30 minutos con 0,3 ml · cm⁻² de membrana de agente de bloqueo DIG Easy Hyb (Roche). Para la preparación del agente de bloqueo se siguieron las instrucciones del fabricante.

12.3. Hibridación

La hibridación se realizó a 50°C durante toda la noche con 0,3 ml · cm⁻² de membrana de disolución de hibridación (10-25 ng de sonda marcada con digoxigenina por cada ml de disolución de prehibridación). Para la desnaturalización de la sonda, anterior a la hibridación, se incubó la disolución de hibridación a 100°C durante 10 minutos y se enfrió rápidamente en hielo durante al menos 5 minutos. Concluido su uso, se conservó a -20°C, pudiéndose reutilizar varias veces, previa desnaturalización.

12.4 Lavados

Una vez retirada la disolución de hibridación, los filtros se lavaron dos veces en una disolución 2X SSC, 0,1% SDS (v/v) a temperatura ambiente durante 5 minutos y con agitación. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 minutos a 50°C en una disolución precalentada que contenía 0,5X SSC, 0,1% SDS (v/v).

Posteriormente, se equilibró con $0,5 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de tampón 1 (0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl, pH 7,5) durante 2-5 minutos a temperatura ambiente y se bloqueó con $1 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de tampón 2 (1% agente de bloqueo de Roche (p/v) en tampón 1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La siguiente incubación se realizó con $0,2 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de tampón 2 más el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina ($750 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, Roche), diluido 20000 veces para análisis Southern, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último la membrana se lavó 2 veces durante 15 min con $1 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de tampón 1 al cual se le añadió 0,3% Tween 20 (v/v), y se equilibró con $0,2 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de tampón 3 (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5) durante 5 minutos.

12.5 Detección quimioluminiscente

En esta ocasión, la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato CDP-Star® (disodio de 4-cloro-3-(metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro) triciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-il) fenil fosfato) (Roche) da lugar, rápidamente, a una señal luminosa que puede detectarse con una cámara de quimioluminiscencia o con películas de autorradiografía. Después de equilibrar la membrana en tampón 3 se colocó sobre una hoja de acetato, se añadieron $0,01 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$ de membrana de la disolución 1% CDP-Star® (en tampón 3, v/v) y se cubrió con otra hoja de acetato, retirando el exceso de líquido. Finalmente, se fotografió la membrana con un sistema digital de fotografía científica Fujifilm LAS-3000.

13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

13.1 Amplificación de fragmentos menores de 4 kb

Para la amplificación estándar de fragmentos de ADN pequeños se emplearon ADN polimerasas termoestables (*BIOTAQTM DNA polymerase* de Boline) en las condiciones de reacción indicadas en la tabla 15. La reacción se realizó con una concentración 300 nM de cada uno de los dos cebadores

empleados; 2.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada uno de los dNTPs y 0,05 Unidad · μl⁻¹ de polimerasa.

Tabla 12. Condiciones de amplificación para la MBL Taq Polimeasa. N es 25 si el molde utilizado es plasmídico y 35 si es ADNg o ADNc; Tan es la temperatura de unión de los cebadores al molde y t_{ext} el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 min por cada kb de producto.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	35 segundos	
Unión del cebador	T _{an}	35 segundos	N
Extensión	72 °C	t _{ext}	
Extensión final	72 °C	7 minutos	1
	10 °C	Indefinido	-

La cantidad de ADN molde empleada fue de 20 ng · μl⁻¹ cuando la reacción se realizó con ADN genómico y de 2 ng · μl⁻¹ cuando se usó ADN plasmídico.

Para realizar la PCR a partir de una colonia bacteriana (PCR de colonia) se tomó la colonia con un palillo de dientes estéril y se resuspendió en 50 μl de H₂O destilada (con el mismo palillo se inocularon 3-5 ml de medio selectivo para la posterior extracción del plásmido), se hirvió durante 10 minutos, se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. Como molde se utilizaron 5 μl del sobrenadante para un volumen de reacción de 10 μl.

13.2. Amplificación de fragmentos mayores de 4 kb

Para la amplificación estándar de fragmentos de ADN grandes se empleó el kit iProof High Fidelity DNA Polymerase (BioRad) en las condiciones de reacción indicadas en la tabla 16 y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 13. Condiciones de amplificación para iProof de alta fidelidad de ADN polimerasa. N es 30 si el molde utilizado es plasmídico y 35 si es ADNg o ADNc; T_{an} es la temperatura de unión de los cebadores al molde y t_{ext} el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1/2 minuto por cada kb de producto.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	98 °C	20 segundos	
Unión del cebador	T_{an}	20 segundos	N
Extensión	72 °C	t_{ext}	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
	10 °C	Indefinido	-

La cantidad de ADN molde empleada fue de $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ cuando la reacción se realizó con ADN genómico y de $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ cuando se usó ADN plasmídico.

13.3. Amplificación de fragmentos de alta fidelidad

La amplificación se llevó a cabo, en las condiciones indicadas en la tabla 17, con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche) para aquellos casos en los que resultó de especial importancia evitar la introducción de errores durante la amplificación. La reacción se realizó con una concentración $0,3 \mu\text{M}$ de cada uno de los dos cebadores empleados; $1,5\text{-}4 \text{ mM}$ de MgCl_2 ; $0,2 \text{ mM}$ de cada uno de los dNTPs y $0,1\text{-}1 \text{ Unidad} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de polimerasa.

La cantidad de ADN molde empleada fue de $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ cuando la reacción se realizó con ADN genómico y de $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ cuando se usó ADN plasmídico. La extensión se realizó a 68°C para los fragmentos mayores de 3 kb y a 72°C para los menores de 3 kb .

Tabla 14. Condiciones de amplificación para la Expand High Fidelity PCR System (Roche). T_{an} es la temperatura de unión de los cebadores al molde y t_{ext} el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 min por cada kb de producto.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	35 segundos	
Unión del cebador	T_{an}	35 segundos	10
Extensión	68 ó 72°C	$t_{ext} + 5$ s/ciclo	
Extensión final	68 ó 72°C	10 minutos	1
	10°C	Indefinido	

13.4. Precipitación de productos amplificados por PCR

Para eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes de una PCR, o bien, cuando fue necesario concentrar el ADN a un volumen menor se precipita el ADN (fragmentos de PCR o ADNg). La calidad de los precipitados obtenidos se comprobaron visualizándolos en gel de 0,7% agarosa (p/v).

- **Precipitación de productos de PCR en un volumen de 50 μ l con Acetato de sodio e Isopropanol:**

Esta técnica se llevó a cabo añadiendo 5 μ l de una solución 3 M de acetato sodio y 35 μ l de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, posteriormente se centrifugó a 12100 g durante 30 minutos a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante con cuidado, se lavó el precipitado en dos ocasiones con 70% de etanol (v/v), seguidamente se centrifugó a 12100 g durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar. Por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

- **Precipitación de ADN:**

La precipitación rutinaria de ADN se llevó a cabo añadiendo 1:10 parte de una solución 3 M de acetato de sodio y tres volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20°C durante 30 minutos y, se centrifugó durante 30 minutos a 12100 g. Después de eliminar el sobrenadante, se lavó dos veces el sedimento con 70% etanol (v/v) y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

- **Precipitación de sondas marcadas con digoxigenina con Cloruro de litio**

La precipitación de sondas marcadas se realizó añadiendo 10% de una solución 8 M de cloruro de litio (v/v) y 3 volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 12100 g. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada.

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

Para la síntesis del ADNc, el ARN se sometió a transcripción inversa con la transcriptasa inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un vial libre de nucleasas y para un volumen final de 20 µl. Se mezcló 1 µg de ARN total, previamente tratado con ADNasa, con 100 pmol cebador oligodT y 0,4 mM dNTPs; la mezcla se llevó hasta 12 µl con agua desionizada estéril y se incubó a 65°C durante 5 minutos. A continuación se introdujo rápidamente en hielo y se añadieron 5X tampón First Strand Buffer (Invitrogen), 4 Unidad · µl⁻¹ de RNAGuard (inhibidor de ARNasas, Amersham) y 5 mM Ditiotreitól (DTT). Se incubó a 37°C durante 2 minutos y transcurrido ese tiempo se añadió la retrotranscriptasa (10 Unidad · µl⁻¹), incubando a 37°C durante 50 minutos más. Por último, para inactivar la enzima, se calentó a 70°C durante 15 min.

13.6. PCR de marcaje

En los análisis de hibridación Southern se usaron sondas bicatenarias marcadas con digoxigenina. El marcaje se realizó por PCR empleando los distintos cebadores y DIG DNA Labeling Mix (Roche), una mezcla que contiene digoxigenina-dUTP junto con los demás dNTPs. Para obtener la sonda bicatenaria se realizó una PCR estándar (35 ciclos) en la que se sustituyeron los dNTPs por DIG DNA Labeling Mix.

13.7. Cuantificación de ADN genómico en raíces y tallos en plantas infectadas con *F. oxysporum* mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación y detección específica del ADN genómico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* durante la colonización de plantas de tomate fue detectada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Para ello, se utilizó como molde el ADN genómico (ADNg) obtenido a partir de raíces o tallos de plantas infectadas, amplificadas con las parejas de oligonucleótidos apropiadas (Six-1 + Six-2 y Gapdh-F + Gapdh-R) (ver tabla 9) y se amplificaron productos entre 160 y 300 pb.

Para cada muestra de ADNg se realizaron tres réplicas técnicas simultáneas. La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Bio-Rad) con un equipo *iCycler iQ real-time PCR System* (Bio-Rad). Por cada reacción se añadieron 7.5 µl de *iQ SyBR Green Supermix* (Bio-Rad), 6.9 µl de ADNg diluido en agua desionizada estéril (1:1) y 300 nM de cada oligonucleótido en un volumen final de 15 µl. Para cada réplica técnica se usaron alícuotas de una misma mezcla. Las condiciones de amplificación se detallan en la siguiente tabla 18.

Tabla 15. Condiciones de amplificación de la PCR a tiempo real para la cuantificación de ADN genómico

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

Terminada la PCR se realizó una curva de desnaturalización (curvas de Melting) para analizar los productos obtenidos tras la PCR. Para ello se programó el equipo para que se produjera un aumento de 0.5°C cada 10 segundos, comenzando a los 55°C hasta alcanzar los 95°C, determinándose la fluorescencia tras cada aumento de temperatura.

La curva estándar, utilizada para extrapolar los datos de amplificación de las muestras problema, se realizó representando el logaritmo de cantidades conocidas de ADN fúngico (diluciones seriadas de 100 ng a 1 pg/25 µl de reacción) frente a los valores de ciclo umbral de amplificación (Ct) obtenidos en estas amplificaciones. Para simular las condiciones de amplificación de las muestras problema, se añadió ADNg extraído de plantas no infectadas a cada mezcla de reacción estándar. En teoría, para que la eficiencia de la reacción de amplificación sea del 100 %, el valor de Ct debe disminuir una unidad conforme el número de moléculas de ADN empleadas como molde se duplique (Mercado-Blanco *et al.*, 2003).

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

$$\text{Expresión relativa (Re)} = 2 - \frac{[(Ct_{hongos(Six)} - Ct_{planta(Gapdh)})^{\text{mutante}} - (Ct_{hongos(Six)} - Ct_{planta(Gapdh)})^{\text{silvestre}}]}{}$$

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

13.8 Cuantificación de ADN genómico en larvas de *G. mellonella* infectadas con *F. oxysporum* mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación y detección específica del ADN genómico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* durante la colonización de larvas de *G. mellonella* fue detectada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) como se describe en la sección 13.7. Para ello, se utilizó como molde el ADN genómico (ADNg) obtenido a partir de larvas infectadas a los 2 días después de la inoculación, amplificadas con las parejas de oligonucleótidos apropiadas (Six-1 + Six-2 y Gall-For + gall-Rev, respectivamente) (ver tablas 9 de oligos) y se amplificaron productos entre 160 y 300 pb.

La curva estándar, utilizada para extrapolar los datos de amplificación de las muestras problema, se realizó representando el logaritmo de cantidades conocidas de ADN fúngico (diluciones seriadas de 100 ng a 1 pg/25 µl de reacción) frente a los valores de ciclo umbral de amplificación (Ct) obtenidos en estas amplificaciones. Para simular las condiciones de amplificación de las muestras problema, se añadió ADNg extraído de larvas control inyectadas con PBS a cada mezcla de reacción estándar. En teoría, para que la eficiencia de la reacción de amplificación sea del 100%, el valor de Ct debe disminuir una unidad conforme el número de moléculas de ADN empleadas como molde se duplique (Mercado-Blanco *et al.*, 2003).

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

$$\text{Expresión relativa (Re)} = 2^{-[(Ct_{\text{hongo (six)}} - Ct_{\text{larva (gall)}})^{\text{mutante}} - (Ct_{\text{hongo (six)}} - Ct_{\text{larva (gall)}})^{\text{silvestre}}]}$$

Como controles negativos se utilizaron larvas control inyectadas con PBS y/o reacciones sin ADN. Los ensayos se repitieron tres veces con replicas biológicas independientes.

14. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN, SCAI (Universidad de Córdoba, España) usando el *Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un aparato *ABI Prism 377 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

15. Transformación genética de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó siguiendo un protocolo basado en el descrito descrito por (Hanahan, 1985), con modificaciones.

- **Obtención de células competentes**

Una colonia fresca de *E. coli* XL1-Blue se inoculó en 5 ml de PSI-b (5 g · l⁻¹ extracto de levadura; 20 g · l⁻¹ triptona y 5 g · l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O. Ajustar a pH 7,6 con KOH. Autoclavar para esterilizar.) y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación. Todo 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 del cultivo a 550 nm (DO₅₅₀) fue de 0,45–0,5. A continuación se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5000g y a 4°C durante 5 minutos. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 ml de disolución Tfb-1 fría (30 mM acetato potásico pH 6,9; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar). Tras una incubación de 5 minutos en hielo se volvieron a centrifugar a 5000 g y a 4°C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 ml de disolución Tfb-2 fría (10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar). Por último, se enfrió en hielo durante 15 minutos,

se distribuyó en viales previamente enfriados en alícuotas de 100 µl por tubo y se conservó a -80°C hasta su uso.

▪ **Transformación de células competentes**

Se usaron 50 µl de células competentes, descongeladas en hielo, a las que se le añadieron 5 µl de una disolución que contenía el ADN y se incubaron 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo las células se sometieron a un choque térmico de 1 min a 42°C e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 minutos.

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

16. Transformación genética de *F. oxysporum* y generación de mutantes

16.1. Obtención de protoplastos: Protocolo basado en el descrito por (Powell y Kistler, 1990), con modificaciones

Se generó un cultivo de 3-5 días de la cepa deseada inoculando en PDB esporas obtenidas a partir de una colonia aislada. Transcurrido este tiempo se recogieron los microconidios y se inocularon 5×10^8 en 200 ml de medio PDB. Tras 12-14 horas de incubación se recogieron las germínulas en filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) y se lavaron con disolución MgP (1,2 M MgSO₄; 10 mM Na₂HPO₄; pH 5,8-6,0 ajustado con ácido ortofosfórico). Las germínulas lavadas se resuspendieron en 20 ml de MgP con 5 % Glucanex® 200G (Novozymes) (p/v), una mezcla de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas, y se incubaron durante 45 minutos a 30°C y con agitación muy suave. Transcurrido este tiempo se comprobó al microscopio la formación de protoplastos. Cuando el número y la calidad de los protoplastos fueron adecuados, la muestra se filtró a través de 2 filtros de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) y se lavó con disolución

STC (0,8 M sorbitol; 50 mM CaCl₂; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) hasta llenar 6 tubos de centrifuga de 30 ml. Posteriormente, se centrifugó a 3000 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 disolución STC y se determinó su concentración utilizando una cámara de Thoma. Se ajustó la concentración a 2×10^7 protoplastos \cdot ml⁻¹ y se repartieron en alícuotas de 100 μ l. A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80°C en 10% PEG (60 % polietilenglicol MW4000 (p/v); 0,6 M MOPS) (v/v) y 1% DMSO (Merck) (v/v).

16.2. Transformación de protoplastos: Protocolo basado en el descrito por (Malardier *et al.*, 1989), con modificaciones

En un vial se mezclaron 1-2 μ g de ADN transformante con 10 μ l de 0,1 M ácido aurintricarboxílico (ATA, fuerte inhibidor de nucleasas) y se llevó a un volumen final de 60 μ l con disolución TEC (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 40 mM CaCl₂). Para experimentos de cotransformación, se añadieron 2 μ g del ADN que confería la resistencia al antibiótico y el doble del ADN de interés. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos, al igual que los protoplastos obtenidos según el protocolo descrito. Transcurrido este tiempo se mezcló suavemente la solución de ADN con los protoplastos y se volvió a incubar en hielo durante 20 minutos. Seguidamente se añadieron y homogeneizaron lentamente 160 μ l de disolución PEG y se prolongó la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los cuales se añadió suavemente 1 ml de disolución STC. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para recoger los protoplastos y éstos se resuspendieron en 200 μ l de disolución STC.

Se mezclaron entonces alícuotas de 50 μ l de la disolución de protoplastos con 3 ml de agar de cobertera (0,4 % agar (oxid) (p/v) en medio de regeneración) a 45°C y se sembraron en medio sólido de regeneración que se incubó a 28°C durante un período de tiempo que varió en función del antibiótico con el que se seleccionó para permitir la expresión del ADN

transformante. Para la selección con higromicina B se mantuvieron durante 12 horas y para la selección con fleomicina, durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo se añadieron otros 3 ml de agar de cobertera que contenían el antibiótico de selección, 2 mg para la higromicina B y 200 μg para la fleomicina. Por último, se prosiguió la incubación a 28°C hasta la aparición de colonias con fenotipo transformante (4-5 días).

Los transformantes obtenidos se sembraron en placas de PDA selectivas como paso previo a la obtención de colonias puras (originadas a partir de un único microconidio). Si la transformación incluyó el gen de resistencia a higromicina se prepararon placas de PDA, con higromicina a una concentración de 55 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Si por el contrario incluyó el gen que confiere resistencia a fleomicina, se prepararon placas de PDA con fleomicina a una concentración de 5,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, ajustando previamente el pH a 8,0. Si se incluyeron ambos genes, el medio se ajustó también a pH 8,0 y se añadieron ambos antibióticos.

16.3. Generación de un mutante nulo $\Delta rim15$ en *F. oxysporum*

La construcción de la interrupción de gen *rim15* de *F. oxysporum* fue generada mediante reemplazamiento génico dirigido empleando la técnica Split Marker (Catlett *et al.*, 2003), con algunas modificaciones (Figura 14A). Por medio de esta técnica, en cada transformación se amplificaron dos fragmentos de ADN solapantes (fragmento 1 y 2) con el kit Taq Polimerasa (BIOLINE Meridian Life Science®). En la primera ronda, uno de los fragmentos contenía la secuencia promotora del gen diana, obtenida tras amplificación mediante PCR con los cebadores específicos (fragmento 1: rim15-1f + hyg-1) sobre ADNg del hongo como molde, fusionada al extremo 3' del casete de resistencia que confiere resistencia a higromicina B (Hyg^r) (marcador seleccionable), mediante PCR de fusión (Carroll *et al.*, 1994), también obtenida por PCR a partir de un vector de dicho casete. El gen de resistencia a higromicina B (fragmento 3), bajo el control del promotor *gpdA* de *A. nidulans* y el terminador *trpC* (Punt *et al.*, 1987) se clonó en el vector pGEMT. Su amplificación se realizó con el kit Expand High Fidelity PCR

System (Roche) y utilizando un molde plasmídico y los cebadores universales M13-For y M13-Rev. El segundo fragmento contenía la región terminadora del gen diana, obtenido por amplificación con cebadores específicos (fragmento 2: hyg-2 + rim15-2r) usando el ADN_g del hongo como molde, fusionado al extremo 5' del casete de resistencia. Para ello, los cebadores del gen diana fueron diseñados con una cola de 30 nucleótidos en el extremo 5' complementarios al extremo 3' ó 5' del casete de resistencia, por lo tanto, susceptibles de fusionar con dicho casete. Una vez amplificados, purificados y cuantificados los tres fragmentos obtenidos por PCR fueron utilizados para hacer una fusión final.

Para la segunda ronda, se realizó una nueva amplificación que se realizó con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche), para cada construcción mediante PCR con cebadores específicos del interior del casete de resistencia y de la región flanqueante del gen diana (fragmento 4: rim15-1n + hyg-G ó fragmento 5, hyg-Y + rim15-2n) de modo que cada construcción era portadora aproximadamente del 75 % de cada extremo del casete de resistencia, incluyendo una región idéntica en ambas construcciones, y 1 kb de la región promotora o terminadora del gen diana. Así, la integración del casete parcial de cada construcción no puede conferir resistencia al antibiótico de selección.

Para la obtención de mutantes con alelos delecionados, los productos obtenidos se purificaron y cuantificaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre 4287 de *F. oxysporum* (ver sección 16.2.). El hecho de recombinación esperado es la sustitución homóloga del gen diana por el casete de resistencia. Para ello, las dos construcciones deben recombinar entre sí en el interior del hongo, obteniéndose una única construcción con el casete de resistencia completo y funcional, y a su vez, dicha construcción deberá recombinar de manera homóloga en el gen diana, sustituyendo el alelo silvestre por el casete de resistencia. Los transformantes resistentes a la higromicina se seleccionaron y se purificaron mediante aislamiento monoconidial como se describió anteriormente (sección 16.2). Los transformantes obtenidos fueron confirmados mediante PCR (Figura 14B)

utilizando cebadores específicos: rim15-1f + hyg-6 y rim15-2r + hyg-Y, y analizados mediante hibridación Southern (Figura 14C); utilizando 10 µg de ADNg de la cepa silvestre y del transformante que fueron tratados con la enzima de restricción *EcoRI* y separados en un gel de 0,7 % agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con las sondas indicadas.

16.4. Generación de la cepa mutante $\Delta slc1a5$ y $\Delta slc7a5$ en *F. oxysporum*

La construcción de la interrupción de los genes *slc1a5* y *slc7a5* en *F. oxysporum* fueron generados por la misma técnica *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003) como se describe en la sección 16.3. En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias adyacentes (fragmento 1 y 2) de los genes a interrumpir (*slc1a5*: 1,0-1,2 kb) y *slc7a5*: 1,1-1,2 kb) y el gen marcador (fragmento 3), que confiere resistencia a higromicina B (Hyg^r) (marcador seleccionable). Las secuencias adyacentes se amplificaron a partir de ADN genómico mediante PCR con pares de cebadores for + hyg-1 (fragmento 1) y rev + hyg-2 (fragmento 2), respectivamente. Una vez amplificados, purificados y cuantificados los tres fragmentos obtenidos por PCR fueron utilizados para hacer una fusión final (Figura 34 y 35A).

Se realizó una segunda reacción de PCR de fusión empleando como molde los productos obtenidos en la primera PCR de fusión que contenía los cebadores for-nest + hygG ó rev-nest + hygY, para la amplificación de los fragmentos de fusión 5' slc+Hyg (fragmento 4) y 3' slc+Hyg (fragmento 5), respectivamente. Los productos obtenidos se purificaron y cuantificaron para transformar protoplastos de la cepa de *F. oxysporum* tipo salvaje 4287. Los transformantes resistentes a la higromicina se seleccionaron y se purificaron mediante aislamiento monoconidial como se describió anteriormente (sección 16.2.). Los transformantes obtenidos fueron confirmados mediante PCR utilizando cebadores específicos: for + hyg-6 y rev + hyg-Y (Figura 34 y 35B), y analizados mediante hibridación Southern; utilizando 10 µg de ADNg de la cepa silvestre y del transformante que fueron tratados con la enzima de

restricción *Pst*I y separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con las sondas indicadas (Figura 34 y 35 C).

16.5. Generación, por mutagénesis dirigida, de una cepa mutante que expresa un alelo constitutivamente activo (*gtr1^{Q86L}*) de la GTPasa Gtr1 en *F. oxysporum*

La introducción de la mutagénesis dirigida empleada fue realizada por la técnica de PCR. Se diseñaron cuatro parejas de oligonucleótidos complementarios, para un alelo constitutivamente activo *gtr1^{Q86L}*, que contenían la mutación que se deseaba introducir, centrada dentro del fragmento de interés (Figura 48A y B). Se realizó una primera PCR empleando las parejas de cebadores: *gtr1*-1f + *gtr1^{Q86L}*-6r y *gtr1^{Q86L}*-5f + *gtr1*-2r (*gtr1^{Q86L}*) (Tabla 9) donde se amplificaron dos fragmentos portadores del alelo *gtr1^{Q86L}* de aproximadamente 2.3 kb y 1.8 kb, respectivamente, con kit iProof High Fidelity DNA Polymerase (BioRAAd).

Una vez amplificados, purificados y cuantificados los cuatros fragmentos obtenidos fueron utilizados para hacer una fusión final, por medio de una PCR de fusión empleando el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Para cada construcción, se utilizó los cebadores específicos *gtr1*-f_{nest} y *gtr1*-r_{nest}, de modo que cada construcción de aproximadamente 3.9 kb era portadora de los cambios realizados.

El producto de PCR obtenido en cada reacción se purificó (usando para ello kits comerciales) y los fragmentos se clonaron en pGem-T. El nuevo ADN plasmídico se sometió a una transformación en células competentes y se purificó por medio del método con CTAB (minipreps). Los ADN plasmídicos se comprobaron por PCR con los cebadores *gtr1*-f_{nest} + *gtr1*-r_{nest} y los productos de la PCR se purificaron para analizarlos por secuenciación (300-500 ng de plásmido + el cebador *gtr1^{S41N}*-for). Por otro lado, se amplificó un fragmento de 3 kb conteniendo el casete de resistencia a fleomicina a partir del plásmido pAN8-1 (Punt *et al.*, 2008),

utilizando los cebadores universales M13-for y M13-rev. Los productos obtenidos se purificaron y cuantificaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* por co-transformación con el casete de fleomicina (Phle^R). Los co-transformantes resistentes a fleomicina se aislaron y se analizaron mediante amplificación y secuenciación de un fragmento de ADN genómico, utilizando los cebadores específicos *gtr1*^{S41N}-for y *gtr1*rev-sonda (Figura 48 C y D).

16.6. Generación de mutantes nulos $\Delta tsc2$, *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ y $\Delta sch9$ $\Delta tsc2$ en *F. oxysporum*

La construcción de la interrupción del gen *tsc2* en *F. oxysporum* fue generada por la misma técnica *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003) como se describe en la sección 16.3. En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias adyacentes (fragmento 1 y 2) del gen a interrumpir y el gen marcador (fragmento 3), que confiere resistencia a higromicina B (Hyg^r) (marcador seleccionable) o con el casete de resistencia a la fleomicina (Phle^R) amplificado a partir del plásmido pAN8-1 (Punt *et al.*, 2008). Las secuencias adyacentes se amplificaron a partir de ADN genómico mediante PCR con pares de cebadores *tsc2*-1f + *hyg*-1 (fragmento 1) y *tsc2*-2r + *hyg*-2 (fragmento 2), respectivamente (Figura 51A).

Se realizó una segunda reacción de PCR de fusión empleando como molde los productos obtenidos en la primera PCR de fusión que contenía los cebadores *tsc2*-1n + *hyg*G ó *tsc2*-2n + *hyg*Y, para la amplificación de los fragmentos de fusión 5' *tsc2*+Hyg (fragmento 4) y 3' *tsc2*+Hyg (fragmento 5), respectivamente. Los productos obtenidos se purificaron y cuantificaron para transformar protoplastos de la cepa de *F. oxysporum* tipo salvaje 4287. Para obtener dobles mutantes, se empleó protoplastos procedente de la estirpe mutante *gtr1*^{Q86L} (obtenido en este trabajo sección 16.5) y del mutante $\Delta sch9$ (realizado en un trabajo previo; Aguilar-Pontes *et al.*, sin publicar). Los transformantes resistentes a la higromicina o fleomicina se seleccionaron y se purificaron mediante aislamiento monoconidial como se describió anteriormente (sección 16.2.). Los transformantes obtenidos fueron

confirmados mediante PCR utilizando cebadores específicos: *tsc2-1f* + *hyg-6* y *tsc2-2r* + *hyg-Y* (Figura 47B), y analizados mediante hibridación Southern (Figura 51C); utilizando 10 µg de ADNg de la cepa silvestre y del transformante que fueron tratados con la enzima de restricción *BamHI* y separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con las sondas indicadas.

A partir de ADN genómico de *F. oxysporum* como molde, se llevó a cabo la complementación de la introducción del alelo silvestre *tsc2* en la estirpe mutante con el alelo interrumpido y un casete de resistencia a la fleomicina (*Phle^R*) amplificado a partir del plásmido pAN8-1 (Punt *et al.*, 2008). Mediante PCR, se obtuvo un fragmento de 7,4 kb de gen *tsc2* que contenía la región codificante completa, que incluye la región promotora y la terminadora, utilizando parejas de cebadores *Tsc2-comp* y *tsc2-2r* (Figura 51A). Los productos obtenidos se purificaron y cuantificaron para transformar protoplastos de la cepa $\Delta tsc2$ por cotransformación con el casete *Phle^R*. Los transformantes resistentes a fleomicina se aislaron y se analizaron como se ha descrito antes (sección 16.2 y Figura 51C).

17. Ensayos fenotípicos del crecimiento y desarrollo fúngico

Los análisis fenotípicos del crecimiento y desarrollo fúngico, se llevaron a cabo mediante la inoculación de concentraciones conocidas de microconidios en placas de Petri con 25 ml del medio rico PDA o en medio mínimo (MM) suplementado con diferentes concentraciones de distintas fuentes de nitrógeno en la ausencia o presencia de rapamicina. Las placas fueron incubadas por 3 a 6 días a 28°C y escaneadas.

Para los estudios de resistencia o sensibilidad del hongo al estrés térmico, osmótico u oxidativo y distintos compuestos que interaccionan con la membrana plasmática y con la pared fúngica, se llevaron a cabo mediante la inoculación de concentraciones conocidas de microconidios en placas de Petri con 25 ml del medio apropiado suplementado con el compuesto químico deseado (Tabla 8). Para el ensayo de sensibilidad al estrés térmico, las

cepas mutantes en estudio se crecieron en YPGA en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa) ó 1 M de sorbitol (Sorb). Las placas fueron inoculadas con 10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ e incubadas durante 24 horas a 28°C y después a 37°C por 4 días. En los ensayos de sensibilidad al estrés osmótico u oxidativo, las cepas se crecieron en YPGA suplementada con 1 M de Sorbitol (Sorb); 1 M de NaCl en la ausencia o presencia de $2 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa) y 0.01% de H_2O_2 ; $10 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ Menadiona (Mn) en la ausencia o presencia de $2 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina. Las placas fueron inoculadas con 5×10^4 ó 10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ e incubadas por 3 ó 4 días a 28°C . Para estudiar la sensibilidad a compuestos que interaccionan con la membrana plasmática y con la pared fúngica, las cepas mutantes en estudio fueron crecidas en 50 mM MES tamponado con YPGA, pH 6,5, suplementada con 0.025% de SDS; $40 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ de blanco de calcoflúor (CFW) y $50 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ rojo congo (CR) en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa) o 1 M de sorbitol (Sorb). Las placas fueron inoculadas con 5×10^4 ó 10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, incubadas por 3 ó 4 días a 28°C .

Para el estudio de la morfología de los microconidios durante la germinación del hongo, se realizaron mediante microscopía de fluorescencia, en germínulas de hasta 14 horas y teñidas con blanco de calcoflúor (CFW 6 mg/ml). Se inocularon 5×10^8 microconidios en PDA en presencia o ausencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina o en MM suplementada con 25 mM de NaNO_3 . Los microconidios se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMR a un aumento de $100\times$ con objetivo de inmersión y utilizando aceite de inmersión (Sigma). Las imágenes fueron fotografiadas con una cámara leica DC 500, utilizando el programa fotográfico Leica IM50 4.0. Montadas y tratadas con el programa Adobe Photoshop®.

La composición de los distintos medios está detallada en materiales y métodos sección 2.2 y 3 (Tabla 8). Todos los experimentos incluyeron tres repeticiones y se realizaron al menos tres veces con resultados similares. Cada una de las placas de los ensayos fueron escaneadas a una resolución de 600-ppp , mediante un escáner Epson 4490 photo.

18. Determinación de la producción de biomasa fúngica

Para la producción de biomasa se inocularon 2.5×10^6 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ de las cepas en estudio de *F. oxysporum*, en matraces de vidrio con 25 ml con medio líquido completo YPG o en medio mínimo suplementado con 25 mM NaNO_3 , mantenidos en un agitador (170 rpm) a 28°C durante 48 horas. A continuación, los cultivos fueron centrifugados durante 15 minutos a 10000 rpm, para obtener una pella (sedimento de microconidios y micelio) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las pellas obtenidas de las distintas cepas en estudio se secaron en un horno a 80°C durante 24 horas, y una vez secado fue pesado en una balanza analítica (en gramos de peso seco). Todos los cultivos inoculados incluyeron tres réplicas biológicas para cada condición y tratamiento.

19. Ensayo de fusión de hifas vegetativas y aglutinación

19.1. Ensayo de aglutinación de germínulas de *F. oxysporum*

Para el desarrollo del ensayo de fusión de hifas vegetativas y de aglutinación (Prados-Rosales and Di Pietro, 2008), se utilizaron tubo de inóculo de 30 ml, inoculando $2,5 \times 10^6$ microconidios frescos en 2 ml de PDB diluído 50 veces en agua estéril y suplementado con la fuente de nitrógeno deseada a una concentración final de 25 mM; la incubación se realizó durante 18 ó 24 horas a 28°C con agitación.

Pasado ese tiempo, el cultivo se agitó vigorosamente durante 15 segundos en un vortex para disgregar las uniones débiles y se contabilizó el tanto por ciento de germínulas fusionadas observándolas en un microscopio (40X de aumento). Para el examen macroscópico de la fusión (aglutinación), se pasaron alícuotas de 1000 μl de cada cultivo a una placa de multipocillo y se observó la presencia de agregados de hifas bajo la lupa estereoscópica (5X de magnificación).

19.2. Cuantificación de fusión de germínulas de *F. oxysporum*

Este ensayo permitió cuantificar la frecuencia de fusión celular, definida como el porcentaje de conidios o germínulas que participan en la fusión, observándolas en un microscopio (40x de aumento). Para cada condición, se analizaron 200 conidios germinados y fusionados con 3 placas de Petri distintas, en tres experimentos independientes.

Se prepararon placas con 4 ml de 0.5 % de agar (Oxoid) suplementado con 25 mM de la fuente de nitrógeno seleccionada, en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina. Se colocó cuidadosamente, una gota de 50 μl de una suspensión de microconidios a una concentración $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en la placa de medio. Ubicando suavemente con la punta de una pipeta un máximo de 4 ó 5 gotas (separadas y etiquetadas) por placa. Sin dejar secar las gotas, las placas se incubaron en un recipiente de plástico cerrado durante 12 horas a 21 °C (para placas con medio suplementado con NH_4NO_3) ó durante 24 horas a 28°C (para placas con medio suplementado con NaNO_3) para registrar el desarrollo celular. Los resultados obtenidos se representaron en una gráfica mostrando el porcentaje de frecuencia de germínulas fusionadas a distintas condiciones de fuente de nitrógeno.

20. Ensayos de crecimiento invasivo

20.1. Ensayo de penetración de membranas de celofán

El ensayo de penetración de celofán (Prados-Rosales and Di Pietro, 2008) permite evaluar 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 de medio mínimo Puhalla con membranas de celofán (ver sección 2.2) y se inoculó el centro de cada una con una gota de 5 μl de una suspensión de microconidios a una concentración de $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$.

Las placas se incubaron a 28 °C durante 4 días. Pasado ese tiempo se retiró la membrana de celofán junto con la colonia fúngica y se incubó durante 2 días más a 28°C. Tanto el crecimiento del hongo antes de retirar el celofán, como la penetración o no del mismo fueron documentadas mediante el escaneo de las placas a una resolución de 600-ppp, mediante un escáner Perfection 4490 photo Epson.

20.2. Colonización de cortes de manzana

La utilización de este sistema artificial de infección permite ensayar un número elevado de cepas en un corto período de tiempo y en un espacio muy reducido. Los frutos de manzana (variedad Golden Delicious) se lavaron bien con agua, se sumergieron durante 5 min en 96% etanol (v/v) y se dejaron secar en el interior de una cámara de flujo laminar. Se hicieron cortes transversales del fruto, con un cuchillo limpio y flameado, de aproximadamente 0,5 cm de grosor y se colocaron en placas de Petri. Se inocularon 5 µl de una suspensión de microconidios a una concentración $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$ pinchando levemente el tejido del fruto con la punta de una pipeta automática; Cada corte de manzana admite un máximo de 6 inoculaciones. Después de la infección, cada corte de manzana se incubó en una placa de Petri cerrada a 28°C con una humedad relativa del 100%. El proceso de infección se evaluó a lo largo de 4 días.

21. Ensayos de infección

21.1. Infección en plantas de tomate

Para estudiar la virulencia de las distintas cepas de *Fusarium oxysporum* se infectaron plantas del cultivar Mónica (Syngenta seeds, Almería, España) con suspensiones de microconidios de las diferentes cepas de *Fusarium*. Los microconidios se recogieron por filtración y posterior centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, se lavaron con agua desionizada estéril y se calculó su concentración tras contarlos al microscopio en una cámara de Thoma.

Las plantas de tomate se cultivaron en vermiculita hasta que presentaron su primera hoja verdadera (10-15 días). Tras retirarlas cuidadosamente de la vermiculita se lavaron las raíces debajo del grifo suavemente. Después se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión acuosa con 5×10^6 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, en placas de Petri. A continuación las plantas se trasplantaron a minimacetas individuales con vermiculita y se cultivaron en una cámara con tubos fluorescentes (36 W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a 28°C.

Durante las tres semanas siguientes a la infección se evaluó la evolución de la enfermedad. Para esta evaluación se establecieron índices de enfermedad, descritos por (Huertas-González *et al.*, 1999), que se corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y pecíolos caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido; 5, planta muerta (Figura 4).



Figura 4. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Huertas-González *et al.*, 1999).

Cada experimento se llevo a cabo al menos 2 veces, con resultados similares. Los datos presentados son de un experimento representativo. La supervivencia fue monitorizada cada día, se estimó y se comparó entre grupos usando el método Kaplan-Meier (utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 3.5") y la prueba log-rank, respectivamente.

21.2. Infección en larvas de *G. mellonella*

Para estudiar la virulencia de la cepa silvestre y las distintas cepas mutantes de *F. oxysporum* se infectaron larvas de *G. mellonella* con suspensiones de microconidios frescos. Para preparar los inóculos, los cultivos del hongo se filtraron por un Monodur para separar las esporas del micelio. El filtrado se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. Los microconidios se resuspendieron en PBS estéril (Solución de buffer salino 1X: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) y se calculó su concentración tras contarlas al microscopio en una cámara de Thoma.

Se seleccionaron al azar de 10 a 15 larvas con peso entre 0.1 y 0.2 g, y se utilizaron por grupos en todos los ensayos. Una jeringuilla (Terumo de 1ml) y un microinyector (Burkard Auto Microapplicator de 0,1 a 10 µl) fueron usados para inyectar 8 µl de una suspensión de microconidios en PBS dentro del hemocele de cada larva, a través de la penúltima pata derecha. 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 con dieta artificial esterilizada. Para la estimación del avance de la infección, se observaron que las larvas infectadas con la estirpe silvestre de *F. oxysporum* desarrollan una progresiva melanización (a las 48 horas después de la inoculación con 1.6×10^5 microconidios, y a las 72 horas tras la inoculación con 1.6×10^4 microconidios) hasta alcanzar la muerte (Figura 5), y además, el número de larvas muertas se determinó diariamente. Las larvas se consideraron muertas cuando no presentaban movimientos en respuesta al toque.



Figura 5. Durante la infección de las larvas de *G. mellonella* infectadas desarrollan una progresiva melanización después de la inoculación con 1.6×10^5 microconidia con la estirpe silvestre de *F. oxysporum*. Las imágenes fueron tomadas en el estereoscopio Leica MZFIII con aumentos de 5x (A-C). La barra de escala equivale a 1 cm.

En cada experimento se emplearon tres tipos de control. El primero fue el control sin inyectar, en el cual las larvas no fueron manipuladas y se incubaron a la misma temperatura e iguales condiciones que las inoculadas. El segundo grupo de control incluyó larvas que recibieron la misma dosis de PBS. Este grupo fue usado como control para monitoreo de la muerte, lesiones físicas o infecciones por patógenos contaminantes. Un tercer grupo control consistió en larvas inyectadas con esporas inactivadas por calor (expuestas a 60°C durante 45 minutos). La inviabilidad de las esporas tratadas por calor se confirmó mediante la ausencia de crecimiento en placas de PDB. En la mayoría de los experimentos, ninguna de las larvas de los grupos control murieron. Experimentos con más de 2 larvas muertas en algunos de los grupos control fueron descartados.

Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de inóculo con la cepa silvestre (wt) de *F. oxysporum* y bajo dos condiciones de temperaturas de incubación (30°C y 37°C). Para determinar la virulencia entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, grupos de 15 larvas fueron inyectadas con 8 µl de una suspensión de 2×10^6 ó 2×10^7 microconidios · ml⁻¹ dentro del hemocele e incubadas a 30°C.

Cada experimento se llevo a cabo 3 veces, con resultados similares. Los datos presentados son de un experimento representativo. 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 Graph Pad Prism versión 3.5") y la prueba log-rank, respectivamente.

Para la observación microscópica, las preparaciones fueron observadas con un microscopio Leica DM 5000B a 63X-100X con objetivos de inmersión, usando aceite de inmersión (Sigma). Las larvas se visualizaron con un sistema óptico Nomarski (usando un polarizador DIC, *Differential Interfase Contrast*), y con filtros de fluorescencia para una longitud de onda de 395 nm (fluorescencia verde GFP). Las imágenes fueron fotografiadas con

una cámara Leica DC500, usando el programa de análisis fotográfico Leica IM50 4.0. Montadas y tratadas con el programa Adobe Photoshop®.

22. Métodos bioinformáticos

▪ Búsquedas mediante blast:

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

▪ Alineamientos:

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

▪ Modelado estructural de proteínas:

A partir de la secuencia de la estructura de las proteínas estudiadas (Rim15, Sch9, Slc1A5, Slc7A5, Gtr1, Gtr2 y Tsc2), se generó el modelado de estructura tridimensional de las proteínas, utilizando el programa el motor bioinformático "Swiss-Model Proteomic serve" (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006) y para la predicción de la topología transmembrana de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de *F. oxysporum*, se usó el motor informático PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

- **Elaboracion de Árboles filogenéticos:**

Esta metodología se utilizó para el análisis filogenético de las proteínas Gtr1 y Gtr2 de *F. oxysporum*. Para ello, con los alineamientos de secuencias de aminoácidos, obtenidos previamente, fueron desprovistos de las zonas no alineadas, mediante el programa *GBlocks v0.91b* (Castresana, 2000). Seguidamente, aplicando el programa *PHYLM v3.0* (Guindon & Gascuel, 2003) se realizó un análisis filogenético con un “bootstrap” no paramétrico de 1000 iteraciones a partir del alineamiento resultante, usando el modelo de sustitución más adecuado. El modelo se determinó tras la optimización realizada por el programa *MODELGENERATOR v0.85* (Keane *et al*, 2006). La relación filogenética obtenida se representó mediante un cladograma construido con el programa *MEGA v4* (Tamura *et al*, 2007).

Capítulo 1. Modelo de infección de *F. oxysporum* en el hospedador invertebrado *G. mellonella*

1. Introducción

Desde los primeros estudios en inmunidad innata, se han utilizado invertebrados como modelos de hospedador. Algunos trabajos han establecido que existe un origen común entre los factores de virulencia y las respuestas del hospedador en infecciones con mamíferos e invertebrados. Además, estudios entre distintas especies de hospedadores mamíferos y no mamíferos pueden ayudar a identificar mecanismos básicos de virulencia en hongos y definir factores que son independientes del sistema modelo usado. En este contexto, los hospedadores modelo representan un puente entre los estudios *in vitro* y los estudios en mamíferos (Mylonakis, 2008).

Por otra parte, los modelos de infección en mamíferos, en particular en ratones, han sido de gran valor para dilucidar los mecanismos de virulencia de microorganismos patógenos (Pradel y 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 no vertebrados pueden proporcionar datos valiosos sin la necesidad de utilizar mamíferos para ensayos *in vivo* o con fines de detección. Los modelos invertebrados como las larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* son éticamente convenientes, relativamente simples y de bajo costo, pudiéndose utilizar tanto para estudios del proceso infeccioso *in vivo*, como las respuestas del hospedador. Trabajos previos detectaron una buena correlación entre los factores de virulencia microbiana y las respuestas del hospedador durante la infección de mamíferos e invertebrados (Brennan *et al.*, 2002; Jander *et al.*, 2000; Mylonakis *et al.*, 2005; Slater *et al.*, 2010).

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* (incubadoras, microscopio, "cámara de vuelo" para *Drosophila*).

Además, *G. mellonella*, puede ser almacenada a temperatura ambiente y no necesita ser propagada en el laboratorio (Mylonakis, 2008). Aunque *G. mellonella* no tiene los beneficios clásicos de un hospedador modelo (el genoma secuenciado) ofrece la ventaja única de poder mantenerse bajo variadas condiciones de temperatura en un rango desde los 25°C a 37°C. 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 y Mylonakis, 2006).

Las larvas de *G. mellonella* han sido utilizadas como modelo de infección para el estudio de patógenos bacterianos humanos como *Burkholderia cepacia complex* (BCC) (Seed y Dennis, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Hendrickson *et al.*, 2001; Jander *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2003), *Bacillus cereus* (Fedhila *et al.*, 2006), *Proteus mirabilis* (Morton *et al.*, 1987) y más recientemente *Francisella tularensis* (Aperis *et al.*, 2007); y hongos patógenos como *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, en las que se observa una correlación significativa en *G. mellonella* y ratones (Brennan *et al.*, 2002), al igual que en *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis *et al.*, 2005), además de *Aspergillus flavus* (St Leger *et al.*, 2000) y *Aspergillus fumigatus* (Reeves *et al.*, 2004) los cuales pueden ser fácilmente estudiados en este modelo (Mylonakis, 2008).

La respuesta de *G. mellonella* a la infección consiste de barreras estructurales y en una respuesta celular y humoral desarrollada por una variedad de tipos de células dentro de la hemolinfa. El sistema de hemolinfa de *Galleria* contiene seis tipos de hemocitos: plasmatocitos, prohemocitos, granulocitos (célula granular), coagulocitos, esferulocitos, y oenocitoides (Burgwyn y Mylonakis, 2006). Los plasmatocitos y granulocitos participan en la fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos que son elementos importantes de la defensa celular de los insectos frente a bacterias y hongos unicelulares (Brennan *et al.*, 2002). La densidad de hemocitos y la sobrevivencia de *Galleria* son indicadores de la patogenicidad. Los hongos no patógenos inducen altos niveles de hemocitos, mientras que los patogénicos

causan una reducción en los niveles de hemocitos. Los hemocitos poseen proteínas similares a p47^{phox} y p67^{phox} de los neutrófilos humanos, los cuales parecen participar en la cascada oxidativa (Bergin *et al.*, 2003).

En el presente trabajo exploramos el uso de *G. mellonella* como un modelo alternativo al ratón para el estudio de los mecanismos de virulencia de *F. oxysporum* en animales. Para optimizar el modelo *Galleria* se realizaron ensayos de infección con distintas concentraciones de inóculo y en dos condiciones de temperatura. Además se ensayó la virulencia de mutantes en algunos genes que juegan un papel importante para la virulencia en ratones inmunodeprimidos y durante en la infección con las larvas de *G. mellonella*.

2. Resultados

2.1. La estirpe silvestre de *F. oxysporum* es capaz de matar y colonizar las larvas de *G. mellonella*.

La inoculación en el hemocele de *G. mellonella* de microconidios de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* FGCC 9935 causó la muerte rápida de las larvas (Figura 6). Tanto la rapidez como la severidad de la mortalidad aumentaron al incrementar la dosis de inóculo fúngico. Mientras que una dosis de $1,6 \times 10^2$ conidios/larva no produjo mortalidad ninguna, un inóculo de $1,6 \times 10^3$ conidios/larva causó una mortalidad significativa ($P < 0,0001$). La tasa de mortalidad aumentó aún más con un inóculo de $1,6 \times 10^4$ y $1,6 \times 10^5$ conidios/larva, tanto a 30°C ($P < 0,0001$ para ambas concentraciones) como a 37°C ($P = 0,1343$ y $0,0018$, respectivamente). La tasa de mortalidad fue más severa a 30°C que a 37°C con todas los tamaños de inóculos ensayados ($P = 0,008$, $0,004$ y $0,004$ para $1,6 \times 10^3$, $1,6 \times 10^4$ y $1,6 \times 10^5$ conidios/larva, respectivamente).

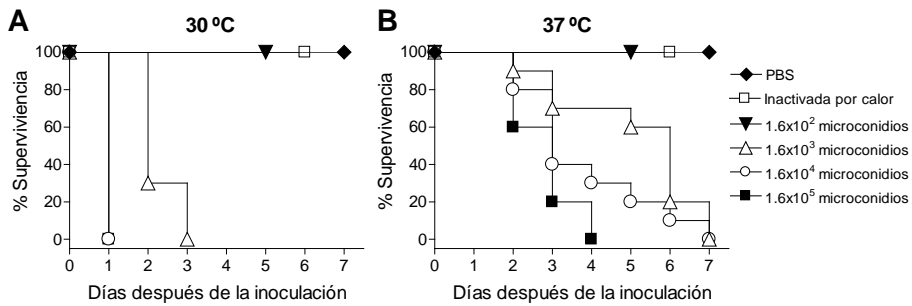


Figura 6. Ensayo de infección con la cepa silvestre de *F. oxysporum* en larvas de *G. mellonella*. Grupos de 10 larvas fueron inoculadas por inyección en el hemocele de las cantidades de microconidios indicadas e incubadas a 30°C (A) o 37°C (B). El porcentaje de supervivencia fue anotado durante 7 días. Las larvas inoculadas con PBS o con esporas inactivadas por calor no murieron, al igual que las larvas sin inyectar (datos no mostrados). Los datos proceden de un experimento representativo. Los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces con resultados similares.

El tratamiento control con microconidios matados por calor no produjo efecto perjudicial en las larvas, sugiriendo que *F. oxysporum* mata a *G. mellonella* a través de un mecanismo activo de infección, más que por un efecto meramente físico de los conidios. Esta idea es reforzada, además, por el análisis por microscopía de fluorescencia de muestras de la hemolinfa, obtenidas a partir de larvas infectadas con un transformante de *F. oxysporum* portador del gen *gfp*. Se observó que los microconidios y las germínulas del hongo son atrapados por los hemocitos mediante procesos de nodulación, encapsulamiento o fagocitosis (Figura 7). Se ha descrito que los hemocitos de *G. mellonella* desarrollan una respuesta celular y humoral frente a la invasión por microorganismos (Tojo *et al.*, 2000). También se observó que las células de *F. oxysporum* fueron rodeadas por múltiples capas de hemocitos (Figura 7A-F), un proceso conocido como nodulación (Tojo *et al.*, 2000). Sin embargo, en muchas ocasiones la eficiencia de los hemocitos en inactivar los propágulos fúngicos fue limitada. Con frecuencia se observó la germinación de conidios fagocitados que fueron capaces de escapar de los hemocitos mediante el crecimiento de las hifas (Figura 7G-I).

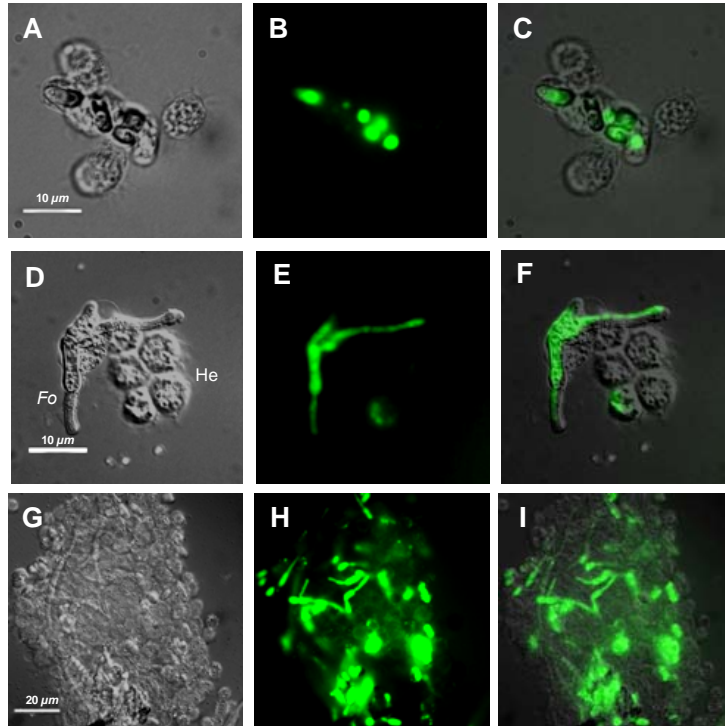


Figura 7. Interacción entre *F. oxysporum* y hemocitos de *G. mellonella*. La hemolinfa de larvas de *G. mellonella* inoculadas con $1,6 \times 10^3$ microconidios de un transformante de *F. oxysporum* portador del gen *gfp* fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia Leica DMR. (A, D, G) imágenes obtenidas por la técnica Normarski, (B, E, H) imágenes de epifluorescencia (usando la fluorescencia verde GFP), (C, F, I) solapamiento de ambas imágenes. Se aprecia la fagocitosis (A-C) y nodulación (D-F) de propágulos de *F. oxysporum* por los hemocitos de *G. mellonella*, y el escape de las hifas del hongo de la fagocitosis por los hemocitos (G-I). Fo, *F. oxysporum*. He, Hemocito. Aumento de 63X. Las barras de escala equivalen a 10 ó 20 μm .

Como resultado de la proliferación del hongo, las larvas de *G. mellonella* desarrollaron una melanización progresiva y la mayoría de los individuos muertos mostraron un color negro (Figura 8A-C). Después de matar a los insectos, *F. oxysporum* fue capaz de colonizar el cuerpo de las larvas muertas, produciendo hifas aéreas que emergían de las aberturas traqueales (Figura 8D y E). En conjunto, estos resultados demuestran que el aislado de *F. oxysporum* FGSC 9935 tiene la capacidad de infectar, colonizar y matar *G. mellonella* tras la inyección de conidios dentro del hemocele.

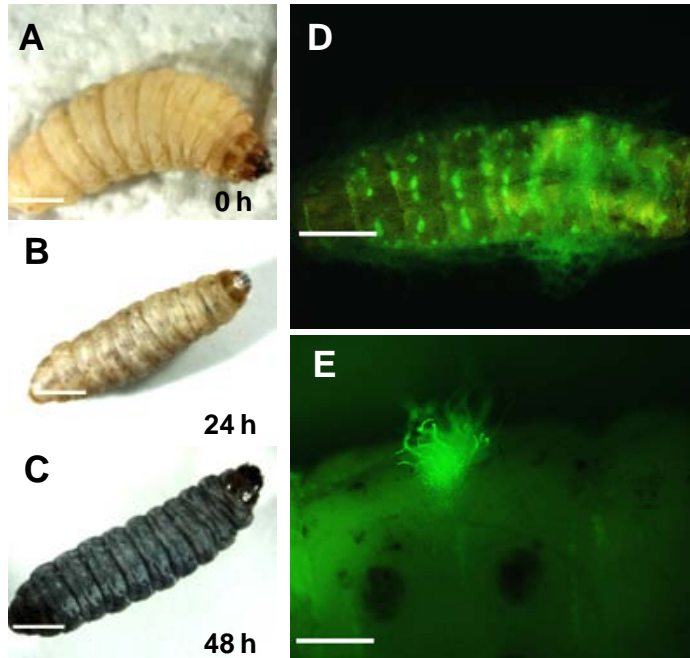


Figura 8. Colonización y muerte de las larvas de *G. mellonella* por *F. oxysporum*.

A-C. La melanización forma parte de la respuesta del insecto a la infección por el hongo. Las larvas desarrollan una progresiva melanización, 0, 24 o 48 horas después de la inoculación con 1.6×10^3 microconidia de *F. oxysporum* e incubación a 30°C. D-E. Crecimiento del transformante de *F. oxysporum* portador del gen *gfp*. La cepa silvestre fue capaz de salir a través de la cutícula, específicamente en las regiones intersegmentales donde la cutícula es más delgada, por las tráqueas y por el sitio del pinchazo, cubriendo posteriormente toda la larva. Las imágenes fueron tomadas en una lupa Leica MZFIII con aumentos de 5X (A-C), 8X (D), 20.4X (E) y utilizando la fluorescencia verde GFP. La barra de escala equivale a 1 cm.

2.2. Distintos mutantes de *F. oxysporum* difieren en su virulencia en *G. mellonella*.

Con el fin de confirmar la utilidad del modelo de infección *G. mellonella*, se examinaron diferentes mutantes de *F. oxysporum* obtenidos en estudios previos, afectados en genes importantes para la virulencia en plantas de tomate o en ratones inmunodeprimidos (Tabla 17). Las larvas infectadas fueron incubadas a 30°C (inóculo $1,6 \times 10^3$ conidios/larva) o a 37°C ($1,6 \times 10^4$ conidios/larva) (Figura 9A y B).

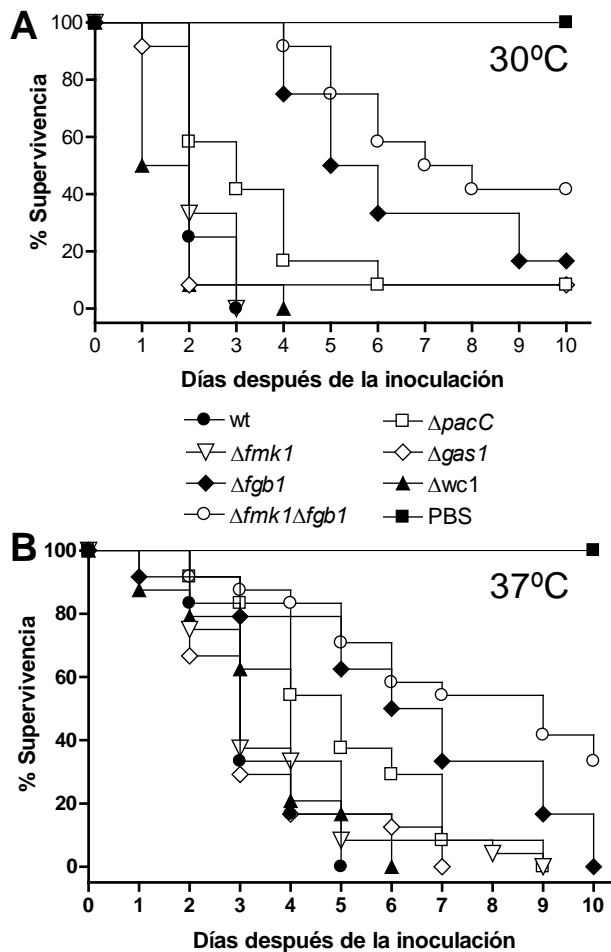


Figura 9. Papel de diferentes genes en la virulencia de *F. oxysporum* en *G. mellonella*. Gráficos de supervivencia de *G. mellonella* después de la inoculación. Grupos de 15 larvas fueron inoculadas por inyección con 1.6×10^3 (A) o 1.6×10^4 (B) microconidios dentro del hemocele con las cepas indicadas e incubadas a 30°C (A) y 37°C (B), respectivamente. El porcentaje de supervivencia fue anotada durante 10 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo.

Los mutantes de *F. oxysporum* que carecen de la MAPK Fmk1, de la β -1,3-glucosiltransferasa Gas1 o del factor de transcripción de respuesta a la luz azul Wc-1, no mostraron diferencias significativas en la mortalidad, en comparación con la estirpe silvestre ($P < 0.05$ fue considerado significativo). Por tanto, estos componentes no parecen ser necesarios para la virulencia de *F. oxysporum* en *G. mellonella* (Figura 9A y B; Tabla 16). En cambio, un

mutante que carece del factor de transcripción del tipo dedo de zinc que responde al pH del ambiente, PacC, mostró una reducción significativa ($P < 0.05$) en virulencia. Por otro lado, el mutante que carece de la subunidad β de proteína G heterotriméricas Fgb1 fue aun menos virulento que el mutante $\Delta pacC$, mientras que el doble mutante $\Delta fmk1\Delta fgb1$ fue incluso más atenuado que las dos cepas anteriores. De acuerdo con los resultados de mortalidad, las larvas infectadas con el mutante $\Delta fgb1$ y el doble mutante $\Delta fmk1\Delta fgb1$ tuvieron una carga fúngica significativamente inferior al día 2 tras la inoculación ($P < 0.05$) que los inoculados con la estirpe tipo silvestre (Tabla 17).

Tabla 16. Carga fúngica en larvas de *G. mellonella* inoculadas con diferentes cepas de *F. oxysporum*.

Cepa de <i>F. oxysporum</i>	Media Log ₁₀ cfu/larva \pm SD ^a
FGSC 9935	4,32 \pm 0,82
$\Delta fmk1$	4,45 \pm 0,93
$\Delta fgb1$	3,27 \pm 0,45 ^D
$\Delta fmk1\Delta fgb1$	3,30 \pm 0,41 ^D
$\Delta pacC$	4,23 \pm 0,60

^a Inoculación con 1.6×10^3 microconidios/larva; incubación a 30°C por 48 horas.

^b $P > 0.05$ frente al silvestre.

Tabla 17. Virulencia de distintos mutantes de *F. oxysporum* en modelos de insecto, mamífero y planta.

Estirpes	Promedio de tiempo de muerte <i>Galleria mellonella</i> ^a	Virulencia en ratones inmunodeprimidos ^b	Virulencia en plantas de tomate ^b
FGSC 9935	2 días	Virulento (Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)	Virulento (Di Pietro and Roncero, 1998)
$\Delta fmk1$	2 días	Virulento (Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)	No patógeno (Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
$\Delta fgb1$	5,5 días ^C	Reducida (Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2006)	Muy reducida (Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005)
$\Delta fmk1\Delta fgb1$	7,5 días ^C	Muy reducida (Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2006)	No patógeno (Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2005)
$\Delta pacC$	3 días ^C	Muy reducida (Ortoneda <i>et al.</i> , 2004)	Virulento (Caracuel <i>et al.</i> , 2003)
$\Delta wc-1$	1,5 días	Reduced (Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2008)	Virulento (Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2008)
$\Delta gas-1$	2 días	Virulento (Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008)	No patógeno (Caracuel <i>et al.</i> , 2005)

^a Promedio de tiempo de muerte a 30 °C fue calculado por el test de Kaplan-Meyer utilizando el software Pad Prism, versión 3.5 para Windows.

^b Resultados obtenidos en estudios previos (ver referencias indicadas).

^C $P > 0.05$ frente al silvestre.

Capítulo 2. Papel de la cascada TOR en desarrollo y patogénesis de *F. oxysporum*

Componentes aguas abajo de TOR

1. Introducción

En mamíferos, los sustratos mejor caracterizados de mTORC1 son la proteína quinasa S6K (S6 kinase) y la proteína 4E-BP1 (4E-binding protein 1), mediante las cuales mTORC1 estimula la síntesis de proteínas (Wullschleger *et al.*, 2006). S6K es fosforilada y activada directamente por mTORC1, y fosforila a su vez la proteína ribosomal S6, promoviendo así el inicio de la traducción. Por otro lado, la proteína 4E-BP1 (4E-binding protein 1) es fosforilada e inactivada por mTORC1, anulando de esa manera la inhibición del factor de inicio de la traducción eIF4E, responsable del reconocimiento de los mARNs con 7-metil guanosina (m7G). En *S. cerevisiae*, el principal sustrato de TORC1 es Sch9, que será descrito con más detalle en el apartado 2 de este capítulo. Sch9 es necesario para la activación de la biogénesis de ribosomas y la iniciación de la traducción estimulada por TORC1. Además, participa en la inhibición de la entrada en la fase G₀, dependiente de TORC1 (Hall y Durán 2012). La entrada de la fase G₀, proceso clave en el desarrollo de las células eucariotas, es controlada por la proteína quinasa Rim15. La vía de TORC1 controla la localización subcelular de Rim15 de manera indirecta, mediante la regulación de la actividad de la quinasa Sch9 (Kaffman *et al* 1998).

1.1 La proteína quinasa SCH9

La quinasa Sch9 es un sustrato directo de TORC1 y un componente importante de la vía de señalización TORC1 en *S. cerevisiae*. TORC1 regula la biosíntesis de ribosomas, la iniciación de la traducción, el tamaño celular y la entrada a la fase estacionaria, en gran parte a través de Sch9 (Urban *et al.*, 2007). Varios residuos en la región C-terminal de Sch9 son directamente

fosforilados por TORC1, y dicha fosforilación se suprime en hambre de carbono o nitrógeno o cuando las células son sometidas a distintas condiciones de estrés. La disminución de la actividad de TOR o el tratamiento con rapamicina provocan una parada del crecimiento que está asociada con cambios fisiológicos característicos de la fase estacionaria G_0 , tal como parada del ciclo celular en G_1 , represión de la transcripción y traducción de ARNm, inducción de genes de respuesta a estrés (*SSA3*, *HSP26* y *HSP12*) y síntesis de glucógeno y trehalosa (Werner-Washburne *et al.* 1993; Jacinto y Hall 2003).

En el presente trabajo se ha utilizado un mutante $\Delta sch9$ de *F. oxysporum* obtenido previamente en nuestro laboratorio (Aguilar Pontes *et al.* sin publicar). Los resultados de este mutante, en combinación con mutaciones dobles en otros genes de la ruta TOR, se describen en el capítulo correspondiente a los componentes aguas arriba de TOR.

1.2. La proteína quinasa Rim15

En *S. cerevisiae*, la proteína quinasa Rim15 controla la entrada en la fase G_0 , un proceso clave en el desarrollo de las células eucariotas (Pedruzzi *et al.* 2003). Durante el crecimiento exponencial y la adaptación al hambre de nutrientes, Rim15 integra señales provenientes de tres distintas quinasas sensoras de nutrientes, TOR, PKA y Sch9, desempeñando un papel central en la regulación de procesos como la proliferación, la diferenciación y el envejecimiento. En presencia de nutrientes esenciales como el fosfato y el nitrógeno, la acumulación de Rim15 es antagonizada por las vías TORC1 y Pho80-Pho85 (Wanke *et al.*, 2005). Rim15 es necesaria para la inducción de procesos característicos de la fase G_0 durante el hambre de nutrientes, tal como la transcripción de *Msn2/Msn4* y los genes dependientes de *Gis1* (Reinders *et al.*, 1998; Cameroni *et al.*, 2004). Las células que carecen de Rim15 son incapaces de detener el crecimiento y de entrar en G_0 , bajo limitación de nutrientes (Reinders *et al.*, 1998). Además, dichos mutantes muestran un retraso en el inicio de la meiosis y una baja eficiencia de

esporulación, comparada con las células diploides de la estirpe silvestre (Vidan y Mitchell, 1997).

Por lo tanto, Rim15 detecta el estado de nutrientes/energía de la célula y transduce la señal correspondiente a las dianas específicas aguas abajo, con el fin de garantizar la inducción de las respuestas apropiadas (Cameroni *et al.*, 2004).

Para garantizar la integración de diversas señales de nutrientes, tanto la actividad enzimática como la localización de Rim15 están reguladas por la interacción de al menos cuatro diferentes quinasas sensoriales de nutrientes (Figura 10) (Wanke *et al.*, 2005; Pedruzzi *et al.*, 2003). Además, la transcripción de *Rim15* es también regulada, lo que garantiza que la expresión completa de *Rim15* solo ocurra bajo condiciones de ausencia de nutrientes, tales como los que la célula encuentra durante el cambio diaúxico o tras la transferencia a un medio que induce la esporulación (Reinders *et al.*, 1998; Vidan y Mitchell, 1997).

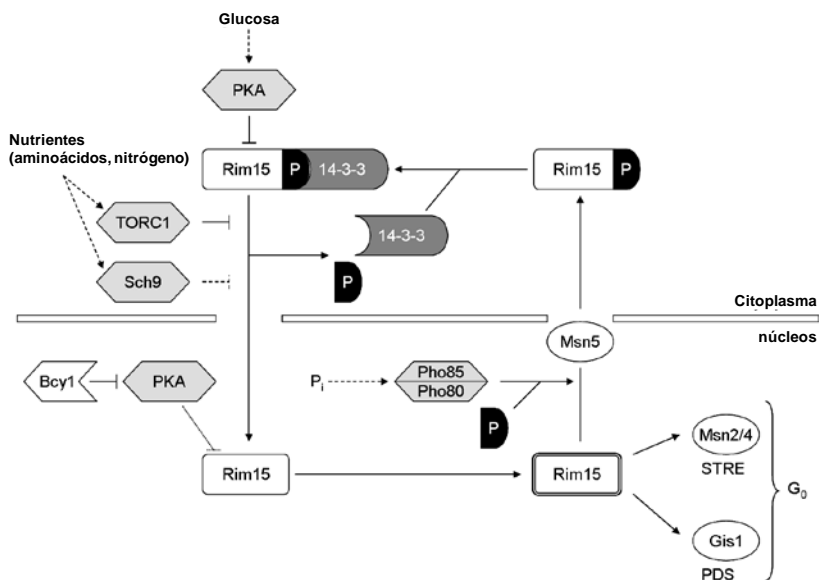


Figura 10. Integración de las señales de nutrientes por Rim15 (Swinnen *et al.*, 2006).

En presencia de nutrientes esenciales como el fosfato y el nitrógeno, la acumulación de Rim15 es antagonizada por las vías TORC1 y Pho80-Pho85 (Wanke *et al.*, 2005), los cuales afectan a un residuo de treonina común (T1075) situado en una región de aminoácidos inusual entre los subdominios VII y VIII del dominio quinasa de Rim15. La fosforilación de Rim15 en T1075 resulta en su retención citoplasmática a través de la asociación con la proteína Bmh2 14-3-3 (Wanke *et al.*, 2005). En presencia de glucosa el citoplasma, Rim15 es anclada a través de su unión con las proteínas 14-3-3, manteniéndose inactiva mediante la fosforilación mediada por PKA (Reinders *et al.*, 1998).

Por otro lado, durante el cambio diaúxico o cuando las células son tratadas con rapamicina, así como tras la retirada de fosfato, Rim15 se traslada transitoriamente al núcleo (Wanke *et al.*, 2005; Pedruzzi *et al.*, 2003). De forma concomitante con su translocación nuclear, la proteína Rim15 es hiperfosforilada; esta hiperfosforilación inducida por la translocación depende de la actividad quinasa de la propia Rim15 (Pedruzzi *et al.*, 2003). La autofosforilación no es necesaria para la translocación nuclear de Rim15, ya que se observa acumulación nuclear de mutantes de Rim15 con actividad quinasa inactivada (Wanke *et al.*, 2005). Sin embargo, la fosforilación de Rim15 por su propia actividad enzimática es necesaria para la activación de la enzima y su exportación del núcleo (Wanke *et al.*, 2005). En línea con esta hipótesis, Rim15 silvestre parece ser exportada del núcleo más eficientemente tras la activación que sus homólogos inactivos. Rim15 silvestre no se acumula en el núcleo de células en hambre de nutrientes o tratadas con rapamicina probablemente porque es exportada rápidamente del núcleo al citoplasma (Wanke *et al.*, 2005).

Rim15 actúa como un regulador de la iniciación de la fase de quiescencia en levaduras. En consecuencia, la pérdida de Rim15 causa un fenotipo pleiotropico caracterizado por defectos en diversos procesos celulares, incluyendo la acumulación de trehalosa y glucógeno, desrepresión transcripcional de los genes regulados por nutrientes, inducción de termotolerancia, resistencia al hambre, extensión cronológica del periodo de

vida y la detención de la fase G1 (Cameroni *et al.*, 2004; Preduzzi *et al.*, 2003; Roosen *et al.*, 2005; Wei *et al.* 2008). Recientemente, se ha investigado el efecto de una mutación en el gen *RIM15* y su consecuencia en el estado de quiescencia de las levaduras utilizadas en la producción de “sake”, observándose una relación estrecha entre la fermentación de etanol y la entrada de la quiescencia mediada por Rim15 (Watanabe *et al.*, 2012).

Un estudio en levaduras realizado por Wei y colaboradores (2008), examinó el papel de genes evolutivamente conservados en la regulación del periodo de vida y su participación en la restricción calórica (CR). En este estudio los mutantes de levaduras que carecían de Ras2, Tor1 o Sch9 eran longevos. Se demostró que la proteína quinasa Rim15 es requerida para la extensión del período de vida cronológico de la levadura (CLS) causado por las deficiencias en Ras2, Tor1 y Sch9 y por la restricción calórica. La delección de Gis1 y Msn2/4, dos factores de transcripción implicados en la resistencia a estrés, causa una importante reversión del efecto de la restricción calórica en la longevidad. Además, la delección tanto de *RAS2*, *Akt* y *SCH9* en combinación con la restricción calórica causó una mayor extensión del período de vida. Estos resultados son consistentes con la existencia de al menos dos importantes vías regulatorias del período de vida controladas por Ras/cAMP/PKA y Tor/Sch9, las cuales convergen en Rim15. Existen datos que señalan el importante papel de los factores de restricción en respuesta a estrés controlados por Rim15 (Msn2/4 y Gis1), en la mediación del efecto de pro-longevidad en todos los mutantes genéticos longevos con deficiencia de la vías de detección de nutrientes (Figura 11) (Wei *et al.*, 2008).

Por otro lado, estudios recientes por Wei *et al.* (2009) señalan que las vías regulatorias de longevidad controlan el cambio de la respiración a la glicólisis y la biosíntesis del glicerol. Se observó que los mutantes longevos carentes de *Sch9*, *Tor1* o *Ras2* presentan un aumento de la expresión de los genes de biosíntesis de glicerol, cuyos homólogos juegan un papel importante en la modulación del período de vida en organismos que van desde gusanos, moscas y mamíferos. También sugieren que el cambio de la biosíntesis de glicerol es necesaria para la extensión del período de vida en

los mutantes *sch9Δ*. Asimismo sostienen que la sustitución de la fuente de carbono induce en células longevas *Tor1Δ* y *sch9Δ*, la creación un ambiente beneficioso que mimifica las restricción calórica junto con la regulación intracelular de la resistencia a estrés, a través de los factores de transcripción Gis1 y Msn2/4, provocando la extensión del periodo de vida y la resistencia a estrés (Wei *et al.* 2009).

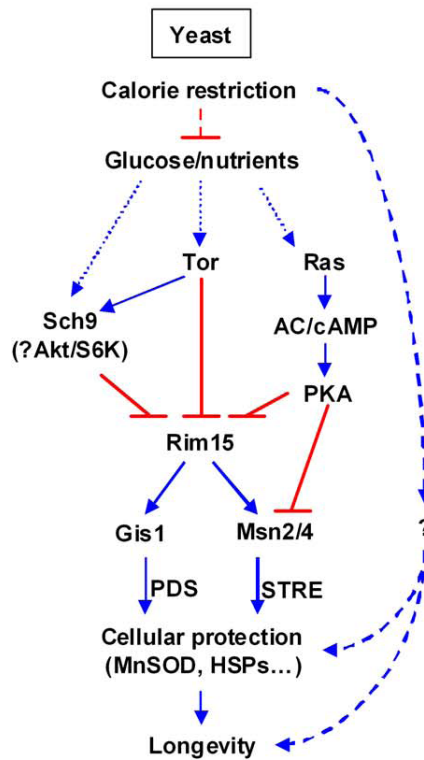


Figura 11. Vías que regulan la longevidad en levadura. Las rutas de detección de nutrientes controladas por Sch9, Tor y Ras convergen en la proteína Rim15. A su vez los factores de transcripción de respuesta a estrés Msn2/4 y Gis1 trans-activan los genes de respuesta a estrés y mejoran la protección celular, que conduce a la extensión del periodo de vida (Wei *et al.*, 2008).

En este capítulo, uno de los objetivos de estudio ha sido investigar el papel del gen *rim15* de *F. oxysporum* y su conexión con la ruta de señalización TOR y la virulencia.

2. Resultados

2.1. Identificación y características de Rim15 de *F. oxysporum*

El gen *rim15* de *F. oxysporum* fue identificado mediante el algoritmo BLASTp en la base de datos genómico de *F. oxysporum* (Número de acceso: FOXG_00074). Utilizando las secuencias aminoacídicas deducidas de la proteína Rim15 de *F. oxysporum* y *S. cerevisiae* se generaron modelos de las estructuras tridimensionales teóricas de estas proteínas (Figura 12) con el programa “Swiss-Model Proteomic serve” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006). Las estructuras secundarias mostradas en la figura 10 resultaron ser muy similares entre ellas, con las mismas láminas β (en color azul), al igual que las cadenas α -hélices (en color amarillo y celeste).

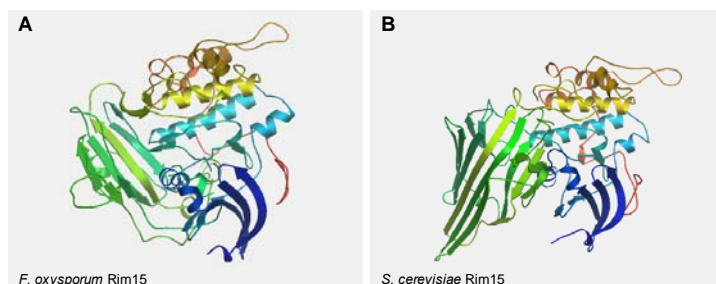


Figura 12. Modelo tridimensional teórico de la proteína Rim15 silvestre de *F. oxysporum* (A) y de las proteínas de *S. cerevisiae* (B). Se representa las estructuras secundarias de las proteínas con las α -hélice y las láminas β . Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático “Swiss-Model Proteomic serve” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006).

Las secuencias de aminoácidos deducidas de la proteína Rim15 de *F. oxysporum*, muestran un alto grado de homología conservada en el dominio PAS de la región N-terminal en diversas especies fúngicas (Figura 13). En un estudio reportaron que las quinasas serina/treonina conteniendo el dominio PAS, funciona como un inhibidor de la actividad enzimática del dominio asociado a quinasas (Amezcuca *et al.*, 2002). La comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína Rim15 de *F. oxysporum* con la proteína Rim15 de diferentes especies fúngicas mostraron los porcentajes de identidad más altos con *F. verticillioides* (98.6% de identidad), *F. graminearum* (93.4%), *M. oryzae* (71.2%), *A. oryzae*

(54.3%), *A. nidulans* (54.1%), *A. fumigatus* (55.1%). Mientras que con las identidades encontradas entre especies fúngicas como *S. pombe* (37.1%), *S. cerevisiae* (32.3%), *C. albicans* (26.9%) fueron bajas.

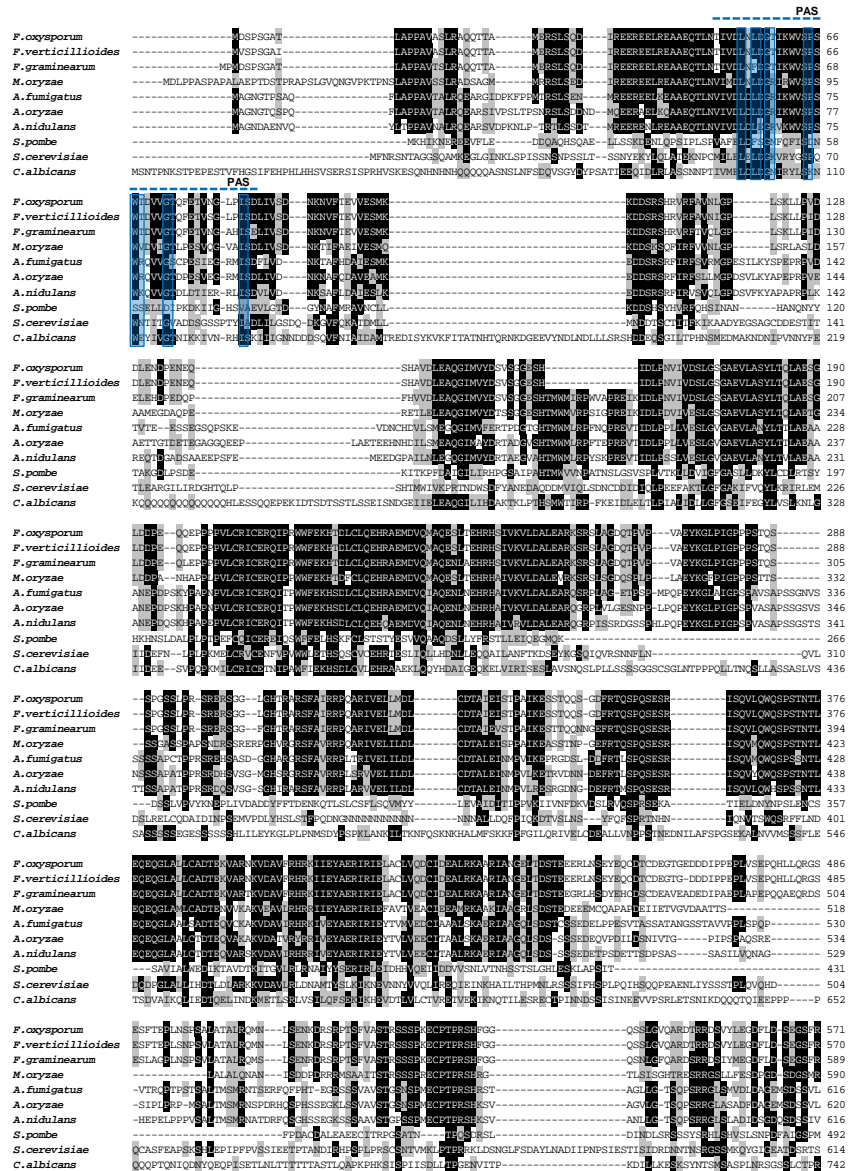


Figura 13. Alineamiento de las proteínas Rim15 fúngicas. Rim15 de *F. oxysporum* se alinó con las proteínas Rim15 de *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *M. oryzae*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y aquellos que tienen características similares en gris (Alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* y *Lasergene*). En color azul se señala el posible dominio PAS de la proteína Rim15 en el extremo N-terminal.

2.2. Interrupción dirigida del gen *rim15*

Para establecer el papel del gen *Rim15* en *F. oxysporum*, se generaron mutantes $\Delta rim15$ mediante reemplazamiento génico. Se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre con un fragmento de ADN lineal conteniendo una copia del gen interrumpido por el casete de resistencia a higromicina B (Figura 14 A). Se seleccionaron transformantes resistentes al antibiótico y se purificó el ADN genómico de los mismos. La comprobación del suceso de recombinación homóloga se realizó en primer lugar mediante PCR usando combinaciones de cebadores del casete higromicina con otros externos a la construcción (*rim15-1f* + *hyg-6* y *rim15-2r* + *hyg-Y*, ver Figura 14A y Tabla 9). Así, se analizaron un total de 30 transformantes, de los cuales cinco mostraron bandas de amplificación del tamaño esperado que reemplazaba al alelo silvestre (Figura 14 B).

La identidad de los mutantes por recombinación homóloga se confirmó mediante hibridación Southern del ADN genómico tratado con la enzima *EcoRI*, utilizando como sonda un fragmento interno de la región codificante del gen *rim15*. La estirpe silvestre mostró una banda de hibridación de 5.8 kb correspondiente al alelo silvestre, que fue reemplazada por una banda de 4.4 kb en los mutantes. Los transformantes ectópicos mostraron la banda del alelo silvestre y otras adicionales correspondientes a inserciones ectópicas del alelo interrumpido (Figura 14C).

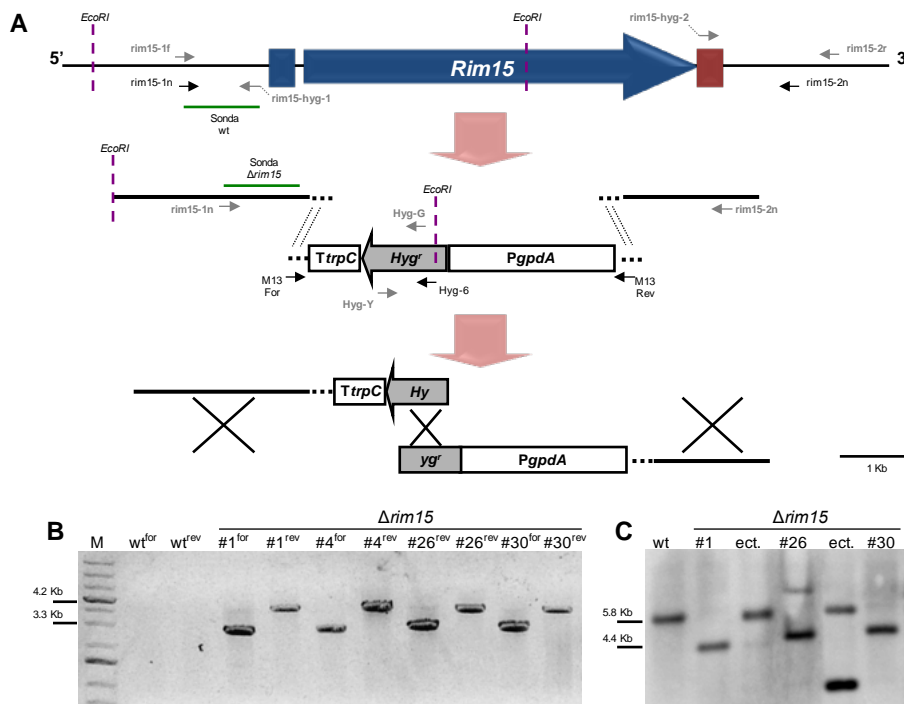


Figura 14. Generación de mutantes nullos $\Delta rim15$ en *F. oxysporum*. (A) Representación esquemática del gen *rim15* y de la construcción de reemplazamiento generada mediante PCR de fusión. (B) Análisis de los transformantes mediante PCR utilizando los cebadores específicos rim15-1f + hyg-6 y rim15-2r + hyg-Y indicados en (A). (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; 10 μ g de ADNg de la cepa silvestre y de los transformantes fueron tratados con la enzima de restricción *EcoRI*, separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con la sonda indicada en (A). wt, estirpe silvestre; #1, #4, #6, #30, mutantes por recombinación homóloga; ect = transformante ectópico.

2.3. Crecimiento y desarrollo de los mutantes

La delección del gen *rim15* no produjo alteraciones significativas en el crecimiento y la morfología de las colonias (Figura15). Las colonias de las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$ en medio mínimo sólido suplementado con distintas fuentes de nitrógeno mostraron un crecimiento similar a la estirpe silvestre (wt). En medio rico PDA, las cepas mutantes $\Delta rim15$ mostraron la formación de abundante micelio aéreo de color blanquecino. Además, los mutantes fueron más resistentes a rapamicina que la estirpe silvestre. En resumen, las alteraciones en el fenotipo de la colonia

de los mutantes *Δrim15* son moderadas y solo afectan de manera leve la utilización de las distintas fuentes de nitrógeno.

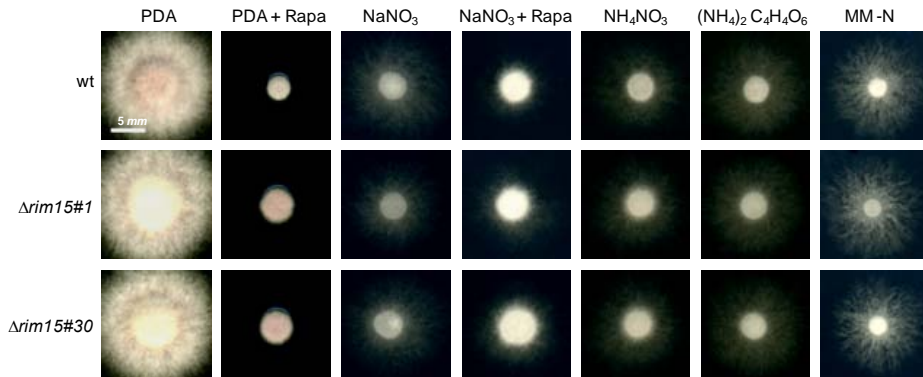


Figura 15. Fenotipo de colonia. La cepa silvestre (wt) y las cepas mutantes *Δrim15#1* y *Δrim15#30* en agar de patata y dextrosa (PDA) o medio mínimo (MM) suplementado con 25 mM de las fuentes de nitrógeno indicadas o sin fuente de nitrógeno (-N), en la ausencia o presencia de 100 ng · ml⁻¹ de rapamicina (Rapa). Las placas fueron inoculadas con 2 x 10⁴ microconidios, incubadas durante 3 ó 4 días a 28 °C y escaneadas. Se muestra un experimento representativo de un total de al menos tres réplicas. La barra de escala equivale a 5 mm.

2.4. Funciones asociadas con la infección: fusión de hifas y crecimiento invasivo

Como medida de la capacidad de *F. oxysporum* de llevar a cabo la fusión de hifas, se determinó la agregación de las cepas en distintas fuentes de nitrógeno (NaNO₃ o NH₄NO₃), y en ausencia o presencia de rapamicina. Al contrario de la estirpe silvestre, los mutantes *Δrim15* germinados en nitrato no formaron una densa red de agregación (Figura 16). En presencia de amonio disminuyó la agregación en todas las cepas ensayadas, tal como se había descrito anteriormente (López-Berges *et al.* 2010). Tanto en la estirpe silvestre como en las cepas mutantes, la falta de agregación de hifas en amonio se revirtió parcialmente en presencia de rapamicina.

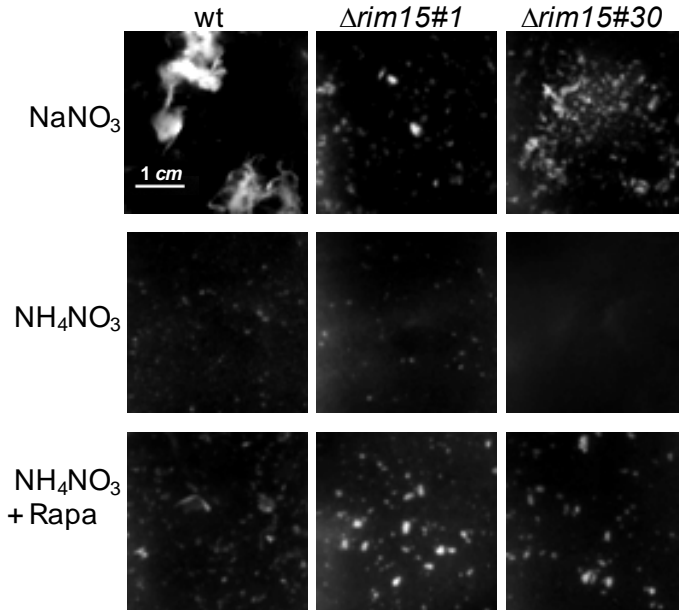


Figura 16. Agregación de hifas. Las cepas indicadas fueron incubadas 24 horas a 28°C en PDB diluido 50 veces y suplementado con 25mM de la fuente de nitrógeno indicada, en la ausencia o presencia de 100 ng · ml⁻¹ de rapamicina (Rapa). Los cultivos se vortexearon durante 1 minuto para disgregar las uniones débiles y se observaron bajo una lupa binocular. La barra de escala equivale a 1 cm.

Para determinar el crecimiento invasivo se analizó la capacidad de atravesar membranas de celofán (Figura 17). Se inocularon 5×10^4 microconidios de las cepas indicadas en placas de medio mínimo (MM), suplementado con 50 mM de NaNO₃ ó NH₄NO₃. La penetración del celofán en la estirpe silvestre fue eficiente en nitrato de sodio pero no en nitrato de amonio (López-Berges *et al.* 2010). Las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$ presentaron un fenotipo similar al de la estirpe silvestre. La penetración de celofán en amonio se restableció en todas las cepas en presencia de rapamicina, aunque el efecto de la rapamicina fue menos evidente en los mutantes $\Delta rim15$.

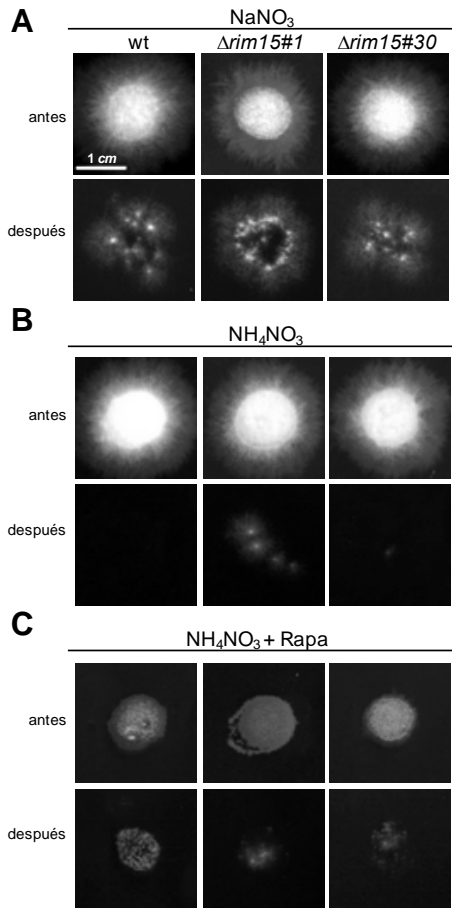


Figura 17. Penetración de membranas de celofán. Se inocularon 5×10^4 microconidios en placas de medio mínimo, suplementado con 50 mM de la fuente de nitrógeno indicada, en presencia o ausencia de 100 ng ml^{-1} de rapamicina, sobre membranas de celofán y se incubaron a 28°C durante 4 días (antes). El celofán con la colonia fúngica fue retirado y las placas fueron incubadas 1 día más para comprobar si existía penetración o no (después). La barra de escala equivale a 1 cm.

Para determinar el efecto de la delección del gen *rim15* sobre la capacidad de proliferar en el tejido vivo del hospedador, se inoculó una suspensión de microconidios de las diferentes estirpes en cortes de manzana. En la Figura 18 se muestra, que la estirpe silvestre colonizó y maceró el tejido alrededor del punto de inoculación, formando un micelio en la superficie, mientras que las estirpes mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$ mostraron un fenotipo ligeramente menos invasivo con respecto al silvestre.

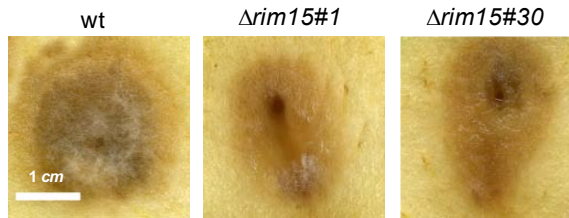


Figura 18. Crecimiento en tejido de cortes de manzana. La invasión y maceración del tejido se evaluó a los 4 días de la inoculación. Se muestra un experimento representativo de un total de al menos tres réplicas. La barra de escala equivale a 1 cm.

2.5. Rim15 contribuye a la virulencia de *F. oxysporum* en plantas y animales

Para evaluar el papel de Rim15 en la virulencia de *F. oxysporum* en plantas, se realizaron ensayos de infección de plántulas de tomate con la estirpe silvestre y las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$. En la Figura 19, se muestra la supervivencia de las plantas infectadas y los datos analizados mediante el método Kaplan-Meier a lo largo de 30 días. La mayoría de las plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre estaban muertas a los 20 días tras la inoculación, sin embargo, el 40% de las plantas inoculadas con las cepas $\Delta rim15$ sobrevivieron al experimento. Se observó una diferencia significativa en el desarrollo de la enfermedad entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta rim15\#30$ ($P = 0,0296$), mientras que entre la cepa $\Delta rim15\#1$ y la silvestre la diferencia no fue significativa ($P = 0,0534$).

Con el fin de estudiar el papel de Rim15 en la virulencia de *F. oxysporum* en un hospedador animal, se analizó la capacidad de las cepas de infectar larvas de *G. mellonella*. Las larvas inyectadas con la estirpe silvestre mostraron signos evidentes de una progresiva melanización, observándose cambios visibles a los tres y cuatro días después de la inoculación. La inoculación con la cepa silvestre produjo una mortalidad de 80% a los tres días, y a los cinco días todas las larvas infectadas estaban muertas (Figura 20). En cambio, las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$ fueron significativamente menos virulentas que la estirpe silvestre ($P < 0,0001$). Tres días después de la inoculación la mortalidad solo fue de un 30% y al cabo de ocho días de 80%.

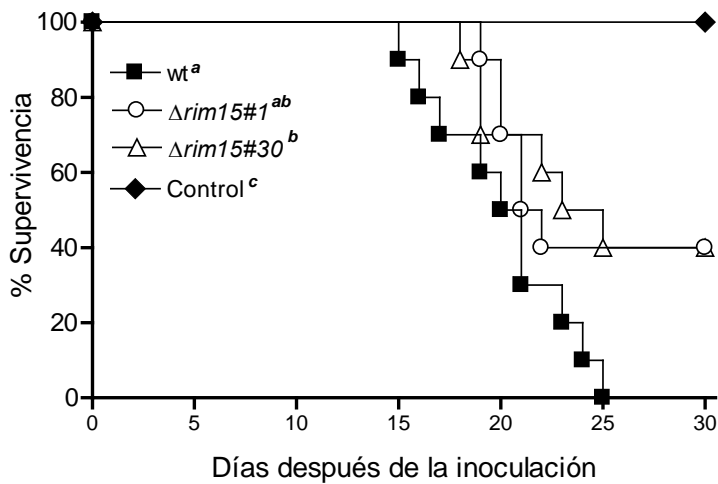


Figura 19. Mortalidad las plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$, $\Delta rim15\#30$. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 30 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo. Los experimentos fueron conducidos al menos dos veces con resultados similares. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

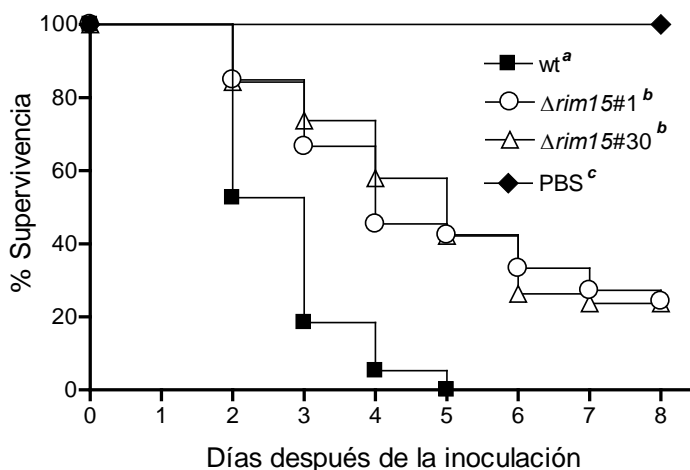


Figure 20. Rim15 contribuye a la virulencia de *F. oxysporum* en *G. mellonella*. Grupos de 15 larvas fueron inoculados por inyección en la hemolinfa de 1×10^4 microconidios de la cepa silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$, e incubadas a 30°C. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 8 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo. Los experimentos fueron conducidos al menos dos veces con resultados similares. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

Por tanto, tanto en los ensayos de infección en tomate como en *G. mellonella*, los síntomas causados por los mutantes $\Delta rim15\#1$ y $\Delta rim15\#30$ fueron atenuados en comparación con los de la cepa silvestre, indicando, que Rim15 contribuye a la virulencia de *F. oxysporum* en plantas y animales.

Componentes aguas arriba de TOR

1. Introducción

Cuatro factores principales regulan la vía de mTORC1 controlando, en su conjunto, el crecimiento celular: los factores de crecimiento, el estado bioenergético de la célula, el estrés y los aminoácidos. (Figura 21) (Wullschleger *et al.*, 2006). Los factores de crecimiento activan mTORC1 a través de PI3K (phosphatidylinositide 3-quinasa) que a su vez activa la quinasa AKT o Proteína quinasa B (PKB). Esta fosforila e inhibe el complejo heterodimérico TSC1/TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa), un inhibidor de la GTPasa Rheb, permitiendo así que esta última active a la quinasa TOR (Yang *et al.*, 2008).

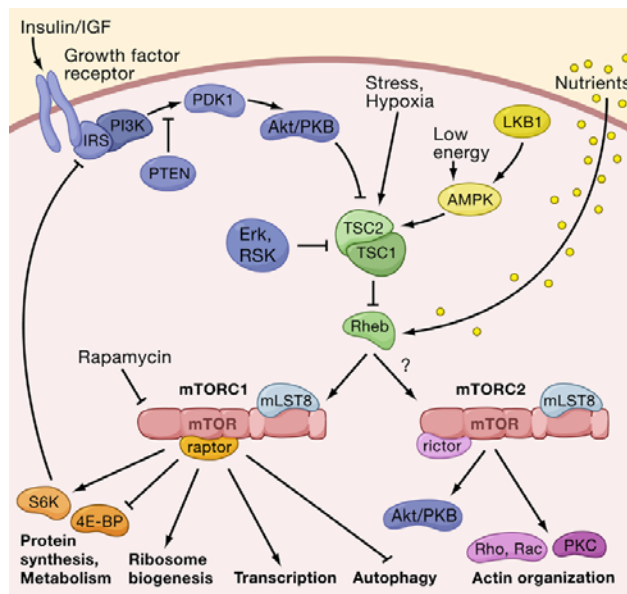


Figura 21. Modelo de señalización por la vía mTOR en mamíferos. mTORC1 responde a factores de crecimiento (Insulina/IGF), el estado energético de las células, nutrientes (aminoácidos) y estrés. Las flechas representan activación, mientras que las barras representan inhibición (Wullschleger *et al.*, 2006).

En este trabajo se han estudiado algunos componentes clave que participan en la regulación de la ruta TOR de *F. oxysporum* y su posible implicación en patogénesis. Se ha descrito que el aminoácido esencial (EAA) leucina regula positivamente la activación de mTORC1. Hasta hace poco no

quedaba claro como la leucina entra en la célula para activar mTORC1 y cuál es el papel de la glutamina en el mecanismo (Laplante y Sabatini 2009; Cohen y Hall, 2009). Recientemente se han identificado dos componentes importantes en este proceso, son los transportadores SLC1A5 y SLC7A5, que funcionan como activadores fisiológicamente relevantes de mTORC1. En primer lugar, SLC1A5 produce un incremento en la concentración intracelular de glutamina, y en segundo lugar SLC7A5/SLC3A5 utiliza la glutamina como sustrato de salida para la absorción de leucina extracelular, que posteriormente conduce a la activación de mTORC1 (Nicklin *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el caso de los nutrientes, varios elementos en particular como los aminoácidos, median la activación de TORC1 (Wullschleger *et al.*, 2006). Un componente clave que participa aguas arriba de TOR, son las GTPasas Gtr1 que activan TORC1 en respuesta a aminoácidos. En mamíferos se ha propuesto, además, que los aminoácidos inducen un aumento en la concentración de calcio intracelular, que a su vez activa mTORC1 a través de PI3K (Hall y Durán 2012). No obstante, un descubrimiento importante para entender el control de mTORC1 fue la identificación del complejo TSC1/TSC2, que es un componente clave aguas arriba de mTORC1 y que regula negativamente a esta vía (Kim y Guan, 2011). Las proteínas Tsc1 (hamartina) y Tsc2 (tuberina) interactúan formando un complejo que controla negativamente la actividad intrínseca de Rheb, una GTPasa pequeña de la familia Ras que juega un papel clave en la activación de TOR.

1.1. Los transportadores de aminoácidos SLC7A5 y SLC1A5

Aun se desconoce el mecanismo exacto por el cual los aminoácidos activan las GTPasas Rag. El sensor inicial parece ser un transportador denominado SLC7A5/SLC3A5, localizado en la membrana celular. SLC7A5/SLC3A5 promueve el intercambio de glutamina intracelular por leucina extracelular, y la pérdida de su función inhibe el crecimiento celular y activa la autofagia (Laplante y Sabatini, 2009).

La disponibilidad de aminoácidos, en particular los aminoácidos esenciales (EAA) como la leucina y la arginina, es necesaria para la activación de mTORC1. En ausencia de leucina o arginina se inhibe la activación de mTORC1 y la eliminación de cualquiera de ellos causa una rápida desfosforilación de los sustratos de mTORC1, S6K y 4E-BP. En oocitos de *Xenopus* la pérdida de transportadores impide la activación de TORC1 por leucina extracelular. Sin embargo, la activación de TORC1 por leucina se recupera en oocitos expresando el sistema de transportadores de L-aminoácidos o en oocitos donde la leucina es incorporada directamente al citoplasma (Christie *et al.*, 2002). A pesar de la importancia de los aminoácidos en la regulación del crecimiento celular, hasta hace poco no quedaba claro como la leucina entra a la célula para activar mTORC1 y qué papel tiene la glutamina en ese proceso (Cohen y Hall, 2009).

Nicklin y colaboradores (2009), utilizando la fosforilación de S6K y 4E-BP como indicador para medir la actividad de mTORC1, mostraron que su activación en respuesta a leucina requiere la carga previa de las células con glutamina. Aunque la glutamina por sí misma no tiene ningún efecto sobre mTORC1, es necesaria su presencia previa en la célula para que la leucina pueda ejercer su efecto activador. Mediante el uso de inhibidores farmacológicos y de ARN de interferencia, se demostró que la absorción de glutamina requiere SLC1A5, un transportador de alta afinidad para aminoácidos neutros que carecen de cadenas laterales ramificadas (Gliddon *et al.*, 2009). Si SLC1A5 es inhibido durante la incubación de células con glutamina, la posterior incubación de las células con leucina no tiene efecto alguno sobre la actividad de TOR. Por lo tanto, la glutamina funciona aguas arriba de la leucina en la activación de mTORC1. Además, se demostró que ninguno de los metabolitos de la glutamina, incluyendo los aminoácidos sintetizados a partir de ella, pueden suplir el papel de la glutamina en la activación de TOR. Por otro lado, el transportador que introduce la leucina para activar mTORC1 es un transportador heterodimérico del sistema de L-aminoácidos llamado SLC7A5-SLC3A5. Dicho transportador funciona como antiportador que importa aminoácidos ramificados como la leucina mientras exporta glutamina (FIGURA 22A). La inhibición de

SLC7A5-SLC3A5 anula la activación de mTORC1 por glutamina y leucina, sin afectar la absorción de glutamina (Figura 22B) (Cohen y Hall, 2009).

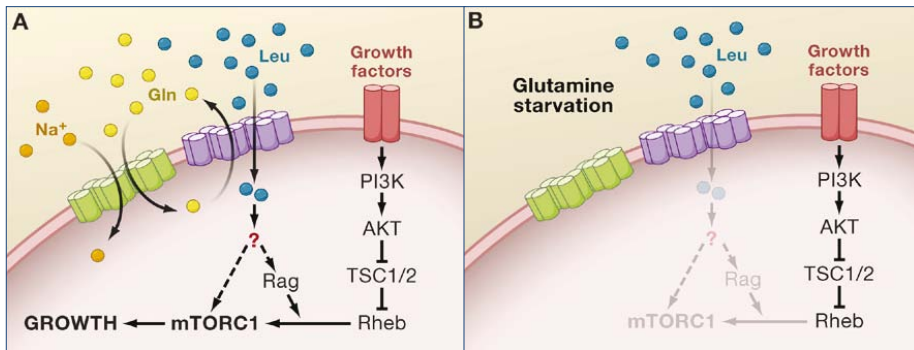


Figura 22. Activación de mTORC1 por absorción de leucina y antiporte de glutamina. (A) La glutamina (Gln) es transportada dentro de la célula de forma dependiente de sodio (Na^+) mediante el transportador SLC1A5 (color verde). La glutamina, a su vez, es utilizada para importar leucina (Leu) a través del antiportador SLC7A5-SLC3A5 (color morado). La leucina intracelular es detectada por un factor desconocido que activa a mTORC1 a través de las GTPasas Rag o por otra vía aun desconocida. Los factores de crecimiento activan mTORC1 mediante la vía PI3K-PDK1-AKT-TSC1/2-Rheb descrita previamente. (B) Cuando las células se encuentran privadas de glutamina, la leucina no puede ser transportada dentro de la célula. Como resultado, mTORC1 no es activado, ni siquiera en presencia de factores de crecimiento (tomado de Cohen y Hall, 2009).

Estudios recientes en *D. melanogaster*, examinaron el papel del transporte de la glutamina y leucina en los procesos fisiológicos regulados por mTORC1, en particular el crecimiento celular y la autofagia (Nicklin *et al* 2009). El transporte reducido de glutamina o leucina debido al silenciamiento de *SLC1A5* o *SLC7A5-SLC3A5*, respectivamente, causa una reducción notable en el tamaño celular. El silenciamiento de *SLC1A5* o la ausencia de glutamina inducen también la autofagia. Por tanto los dos transportadores parecen ser activadores fisiológicamente relevantes de mTORC1. Los resultados obtenidos evidencian un mecanismo en dos etapas en la activación de mTOR por aminoácidos (Figura 23). En primer lugar, SLC1A5 produce un incremento en la concentración intracelular de glutamina, y en segundo lugar SLC7A5/SLC3A5 utiliza la glutamina como sustrato de salida para la absorción de leucina extracelular, que posteriormente conduce a la activación de mTORC1 (Nicklin *et al.*, 2009). Este modelo se basa en la demostración de que SLC7A5/SLC3A5 es un intercambiador obligado y la

absorción de aminoácidos requiere de un sustrato de salida intracelular como la glutamina (Meier *et al.*, 2002).

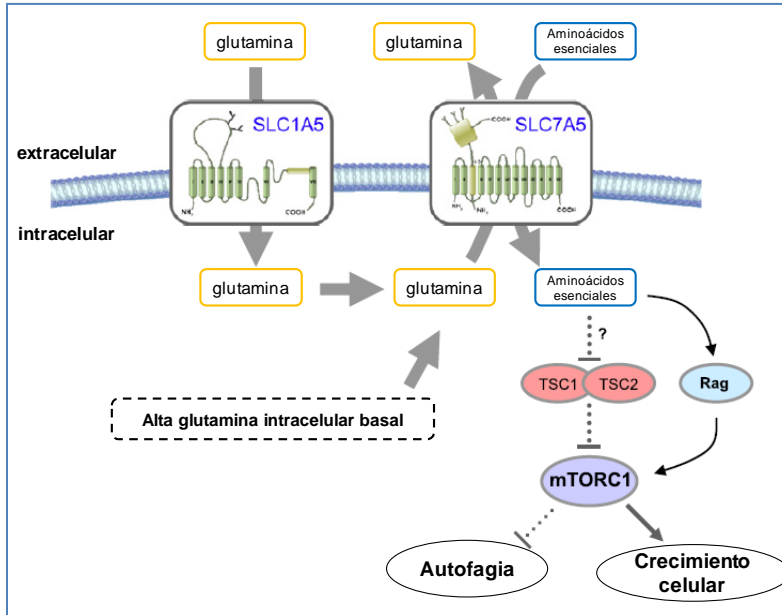


Figura 23. La absorción de aminoácidos esenciales para la señalización de mTOR, el crecimiento celular y la supresión de la autofagia requiere la absorción previa y el posterior eflujo de la glutamina (Nicklin *et al.*, 2009).

1.2. La GTPasa Gtr1

La activación de mTOR requiere la disponibilidad simultánea de aminoácidos, factores de crecimiento y energía. Aunque se conoce relativamente bien el papel de los factores de crecimiento como la insulina, la ruta a través la cual los aminoácidos desencadenan la activación de TORC1 ha sido difícil de esclarecer (Zinzalla y Hall 2008). El agotamiento de los aminoácidos resulta en una rápida desfosforilación de dos componentes aguas abajo de TORC1, S6K y 4E-BP, mientras que la presencia de aminoácidos lleva a una rápida fosforilación, dependiente de TORC1, de dichas moléculas. Kim y colaboradores realizaron una búsqueda en la mosca de la fruta *D. melanogaster*, para identificar componentes que regulan la fosforilación de S6K en respuesta a aminoácidos (Kim *et al.* 2008). Por otro lado, Sancak y colaboradores llevaron a cabo un análisis proteómico en

células de mamíferos con el objetivo de identificar nuevos componentes de unión al complejo TORC1, y demostraron que las moléculas reguladoras identificadas interactúan con raptor, un componente de TORC1 (Sancak y Sabatini 2009).

Ambos estudios identificaron las GTPasas Rag como los principales mediadores de la activación de TORC1 por aminoácidos (Kim *et al.* 2008, Sancak y Sabatini 2008). Las GTPasas reguladoras existen en diferentes variedades y son componentes comunes de las rutas de señalización (Sancak y Sabatini 2009). Están activas cuando se encuentran unidas al nucleótido GTP e inactivas cuando se unen a GDP, el producto de la hidrólisis de GTP. La actividad enzimática intrínseca de las GTPasas convierte el GTP a GDP. Las proteínas activadoras de GTPasa específicas (GAPs) estimulan la actividad enzimática intrínseca de las GTPasas, mientras otros grupos de proteínas llamadas factores de intercambio de GTPasas (GEFs), median la disociación de GDP de GTPasas de modo que la GTPasa pueda unirse a una nueva molécula de GTP y reanudar la actividad (Durán y Hall, 2012).

Las GTPasas Rag están muy conservadas en eucariotas desde la levadura a mamíferos. En humanos existen cuatro genes Rag (RagA-D), con una alta similitud de secuencia entre RagA y RagB y entre RagC y RagD, respectivamente (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). Estas proteínas funcionan como heterodímeros RagA/B y RagC/D, y alteran su estado de activación en función de los niveles de concentración de aminoácidos. La unión de GTP a RagA/B es crucial para la activación y la localización de los heterodímeros. En presencia de aminoácidos, RagA/B se encuentran en estado activo (unido a GTP) e interactúan directamente con raptor, un componente de TORC1, activando la quinasa TOR. La expresión de mutantes constitutivamente activos de las GTPasas RagA/B resulta en la activación de TORC1 incluso en ausencia de aminoácidos (Jung y Kim 2010). La activación de TORC1 mediada por su interacción con las proteínas Rag depende de su redistribución en compartimientos vesiculares que contienen Rab7. Probablemente el mecanismo de activación consiste en la proximidad

física de TORC1 con Rheb, su principal activador (Sancak *et al.* 2008). Rheb estimula directamente la actividad de la quinasa TORC1, conduciendo a la fosforilación de S6K y 4E-BP, los cuales conducen la síntesis de proteínas y al crecimiento celular (Figura 24) (Zinzalla y Hall 2008).

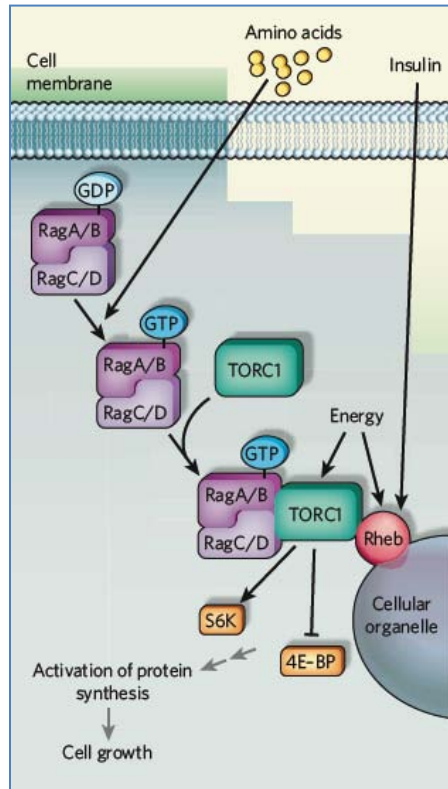


Figura 24. Modelo de la transmisión de la señal de aminoácidos. Las GTPasas Rag están implicadas en la activación de TORC1 en respuesta a la señal de nutrientes. Los aminoácidos son transportados dentro de la célula donde desencadenan una vía de señalización mediada por el complejo multiprotéico TORC1. Uniéndose a TORC1, las GTPasas Rag median su translocación a la membrana intracelular que contiene la GTPasa Rheb. Existen otras señales tales como el nivel de energía intracelular y los factores de crecimiento que se integran con la señal de los aminoácidos, conduciendo a la activación de TORC1 por Rheb, y a la fosforilación de los efectores aguas abajo como S6K y 4E-BP, llevando finalmente a la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Zinzalla y Hall 2008).

En trabajos de Sancak y colaboradores (2008), se demostró que la interacción Rheb-TORC1 depende de la disponibilidad de aminoácidos y que la inhibición de TORC1 después de la retirada de aminoácidos puede ser superada a través del incremento de expresión de Rheb. Estudios previos, describen que Rheb además de ser requerido por los aminoácidos para activar la vía mTORC1, se puede localizar en endosomas/lisosomas tardíos (Sancak *et al.* 2008), lo cual es consistente con el modelo en que los aminoácidos inducen a mTORC1 para asociarlo con el sistema de membrana de la célula y así permitir su encuentro con su activador Rheb. El compartimiento subcelular al cual mTORC1 se dirige tras su activación por aminoácidos, es el lisosoma, un orgánulo multifuncional que puede estar implicado en el proceso de autofagia, a su vez inhibido por TOR. En el lisosoma se identificó un nuevo complejo formado por las tres proteínas MP1, p14 y p18, que une los heterodímeros de Rag mediante interacción directa (Sancak *et al.* 2010). Debido a su función como regulador de las Rags, ese complejo fue denominado “Ragulator”. En el modelo de la figura 25, el papel esencial del complejo Ragulator-Rag es servir como sitio de acoplamiento regulado por los aminoácidos para mTORC1 en la membrana del lisosoma. La vinculación entre las GTPasas Rag y Rheb en la regulación de la vía mTORC1 proporciona una explicación de por qué la activación de mTORC1 ocurre solo cuando los activadores tanto de Rheb (por ejemplo los factores de crecimiento y energía) y las Rags (por ejemplo aminoácidos) están disponibles (Sancak *et al.*, 2010).

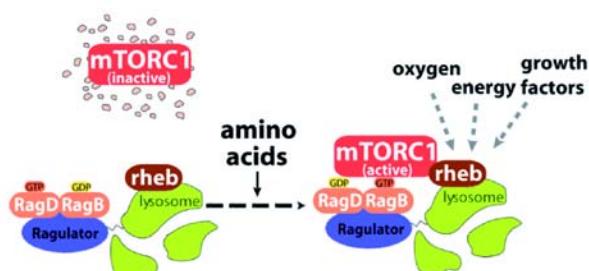


Figura 25. Modelo de la activación de mTORC1 inducida por aminoácidos. En ausencia de aminoácidos, mTORC1 no puede asociarse con el sistema de endomembranas y no tiene acceso a su activador Rheb. En presencia de aminoácidos las GTPasas Rag se unen a la superficie del lisosoma mediante “Ragulator” que sirve como sitio de unión a mTORC1, permitiendo así su asociación con las endomembranas y su activación activado por Rheb (Sancak *et al.*, 2010).

Estudios recientes muestran que una versión de RagA/B que no puede unirse a GTP es incapaz de estimular TORC1, mientras que una versión de RagA/B constitutivamente activa mantendría la actividad de TORC1 incluso en ausencia de aminoácidos (Kim *et al.*, 2008). Interesantemente, la inactivación del complejo TSC1/TSC2, un inhibidor de Rheb, no es suficiente para superar el efecto de la retirada de aminoácidos, sugiriendo que los aminoácidos probablemente median la interacción de TORC1 con una molécula de Rheb ya activada, pero no promueven la activación de Rheb en sí (Zinzalla y Hall 2008).

En levadura, las proteínas Gtr1 y Gtr2 son altamente homólogas a RagA/B y RagC/D y además forman heterodímeros (Figura 26). Gtr1 y Gtr2 son importantes para la recuperación de la célula a partir de un tratamiento con rapamicina y promueven la activación de TOR en respuesta a aminoácidos, indicando que la función de la familia de GTPasa Rag está conservada en eucariotas (Binda *et al.*, 2009). Similar a las GTPasa Rag en mamíferos, en levaduras el complejo Gtr1-GTP y Gtr2-GDP es la forma activa para la activación de TORC1.

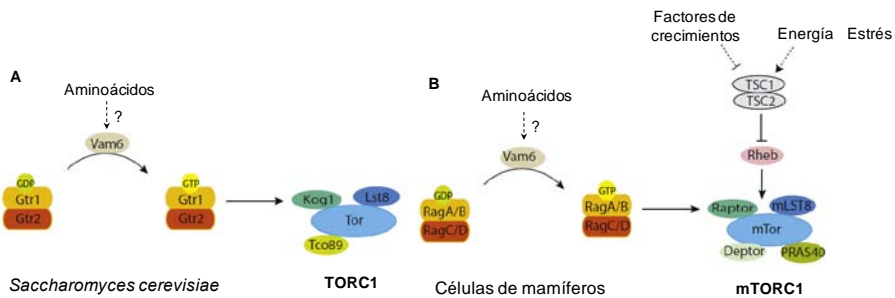


Figura 26. Representación de las funciones de Vam6 y las GTPasas Rag en la activación de TORC1 por aminoácidos. Las proteínas homólogas en *S. cerevisiae* (A) y en humano (B) se muestran en el mismo color. Las líneas discontinuas indican una conexión indirecta, mientras que las flechas continuas indican un efecto directo. Debido a que es desconocido si Vam6 estimula el intercambio de nucleótidos de Gtr2, los nucleótidos de guanina en Gtr2 y RagC/D no se muestran con el fin de evitar posibles confusiones (Tomada de Li y Guan 2009).

Estudios genéticos en levaduras demuestran que las GTPasas Gtr1 y Gtr2 se localizan en la membrana de la vacuola y que tiene una función análoga al lisosoma en mamíferos (Binda *et al.*, 2009). Permanecen ancladas por la interacción con un complejo de tres proteínas, formando un complejo denominado EGO (EGO1 y EGO3), implicado en la regulación de la microautofagia, y que es necesario para la activación de TORC1. El papel de estas proteínas en la activación de TORC1 indica que es el complejo EGO y no solo Gtr1/Gtr2, quienes estimulan la activación de TORC1 en respuesta a aminoácidos (Figura 27) (Sancak *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia de mamíferos donde puede restaurarse la activación de TORC1 mediante una versión RagA/B-GTP en ausencia de aminoácidos, en levadura Gtr1-GTP activa TORC1 solo parcialmente (Li y Guan 2009). Otra diferencia entre levadura y mamíferos es que los aminoácidos aparentemente no alteran la localización subcelular de Tor1 y Tco89 (un componente de TORC1). Además la localización subcelular de Gtr1 y Gtr2 no es afectada por aminoácidos. Ello sugiere que el mecanismo de activación TORC1 por aminoácidos a través de la localización subcelular de TORC1, no está conservado (Valbuena *et al.*, 2012).

Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual los aminoácidos transmiten la señal de activación a las proteínas Rag. Binda y colaboradores (2009), encontraron que la sobreexpresión de Vam6 (Vps39) en levadura suprime el defecto en la activación de TOR en un mutante Gtr1-GDP. Análisis bioquímicos demostraron que Vam6 promueve el intercambio de nucleótidos de guanina de Gtr1, sugiriendo que Vam6 funciona como GEF de Gtr1. La pérdida de Vam6 y Gtr1 afectan similarmente a TORC1. Vam6 estimula la liberación de GDP a partir de Gtr1 y la pérdida de Vam6 reduce drásticamente la interacción entre Gtr1 y Ego1. Por tanto, el complejo EGO actuaría aguas arriba de TOR para regular su actividad (Figura 27). (Loewith y Hall, 2011; Binda *et al.*, 2009).

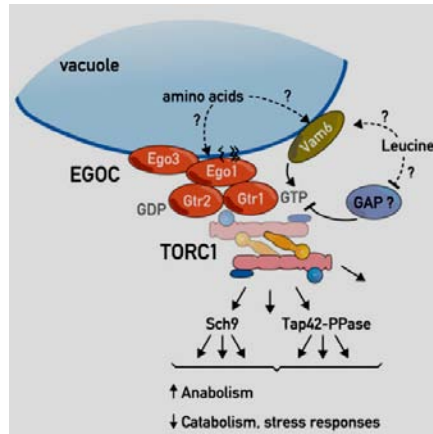


Figura 27. El complejo EGO es un importante regulador de TORC1. El complejo EGO está compuesto de cuatro proteínas: Ego1, Ego3, Gtr1 y Gtr2. Como TORC1, el complejo EGO se localiza en la membrana vacuolar (Loewith y Hall, 2011).

1.3. El complejo de esclerosis tuberosa Tsc2

Los genes *Tsc1* y *Tsc2* de humano fueron identificados en 1993 y 1997, respectivamente, como componentes del locus genético que se encontraba mutado en la enfermedad conocida como complejo de esclerosis tubular (TSC2) (Consortium, 1993; van Slegtenhorst *et al.*, 1997). El producto de estos genes son las proteínas TSC1 y TSC2, las cuales no comparten ninguna homología entre ellas. Aparentemente, el único dominio activo de estas dos proteínas es la región C-terminal del TSC2 con actividad GAP (proteína activadora de GTPasa). TSC1 y TSC2 se asocian formando un complejo heterodimérico. TSC1 es requerido para estabilizar a TSC2 prevenir su degradación mediada por ubiquitinación o su secuestro por unión a 14-3-3 (Li *et al.*, 2002; Shumway *et al.*, 2003). No se conoce otra función para TSC1 que la de estabilizar a TSC2, por lo que mutaciones en TSC1 afectan directamente a la actividad de TSC2 (Hodges *et al.*, 2001). La función principal del complejo es la de actuar como freno de la actividad de mTORC1. En condiciones en la que TSC2 se encuentra estabilizada por unión a TSC1, y por su estatus de fosforilación apropiado, la actividad GAP de TSC2 actúa a través de una proteína G de pequeño tamaño, Rheb, de la superfamilia de

Ras ("Ras-homolog enriched in brain") e impide la activación de mTORC1 (Figura 28) (Huang y Manning, 2008)

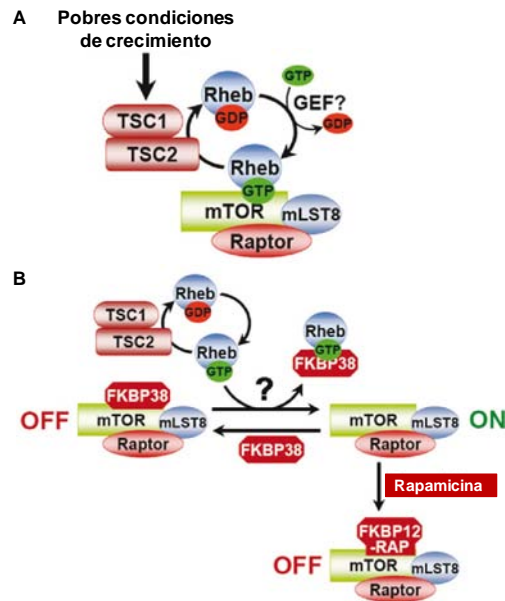


Figura 28. Regulación de mTORC1 por TSC1-TSC2 y Rheb. **A.** Bajo condiciones pobres de crecimiento, el complejo TSC1-TSC2 modula la actividad de mTORC1 a través de Rheb. TSC2 actúa como un GAP para Rheb, estimulando la conversión de Rheb-GTP en Rheb-GDP y por lo tanto, inhabilitando la activación de mTORC1. Bajo condiciones óptimas de crecimiento, Rheb-GTP se acumula y se une directamente a mTOR. **B.** El complejo TSC1-TSC2 actúa como se describe en (A), pero Rheb unido a GTP es un potente activador de mTORC1. Se cree que la interacción de Rheb-GTP con FKBP38 libera a esta última del complejo mTORC1. Cuando FKBP38 se encuentra unido a mTOR, inhibe su actividad de una manera similar a la del complejo FKB12-rapamicina (Huang y Manning, 2008).

En *D. melanogaster*, la inactivación de Rheb afecta el tamaño celular, el ciclo celular y el crecimiento celular, así como la respuesta al estrés oxidativo. Las moscas con actividad de Rheb reducida son hipersensibles a la rapamicina, sugiriendo que Rheb está implicado en la señalización de TOR. Las mutaciones de TSC1 o TSC2 en *Drosophila* incrementan significativamente el tamaño de la célula, lo cual es consistente con su papel negativo en la regulación de TORC1. El descubrimiento de una conexión entre TSC y la vía mTORC1 proporcionó el primer vínculo entre mTORC1 y el cáncer (Tsao *et al.*, 2008).

Ortólogos de las proteínas Tsc han sido identificados en *Schizosaccharomyces pombe*, pero no en *S. cerevisiae* (Aspuria *et al.*, 2007). En *S. pombe*, las mutaciones en TSC2 causan un defecto en la captación de arginina y leucina y, una respuesta tardía al hambre de nitrógeno mediante la parada en fase G1. En *A. fumigatus*, *RhbA*, un ortólogo de Rheb, se induce a nivel transcripcional por hambre de nitrógeno y es capaz de complementar la hipersensibilidad a canavanina en mutantes RHB1 en *S. cerevisiae* (Panepinto *et al.*, 2003). Estudios en *C. albicans* identificaron el ortólogo de Rheb, denominado Rhb1 y el de Tsc2. *RHB1* y *TSC2* están implicados en la filamentación inducida por hambre de nitrógeno, probablemente mediante el control de la expresión de MEP2, una permeasa de amonio y un sensor para la señal de nitrógeno (Tsao *et al.*, 2008). Rhb1 está involucrado también en la ruta MAPK de la integridad celular, indicando una posible conexión entre las rutas TOR y de la MAPK Mkc1. La sobreexpresión de RHB1 y la delección de TSC2 conducen a un defecto en el crecimiento filamentoso en fuentes de nitrógenos a baja concentración (Figura 29). Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, la rapamicina previene el crecimiento filamentoso en respuesta en condiciones bajas de nitrógeno (Tsao *et al.*, 2008).

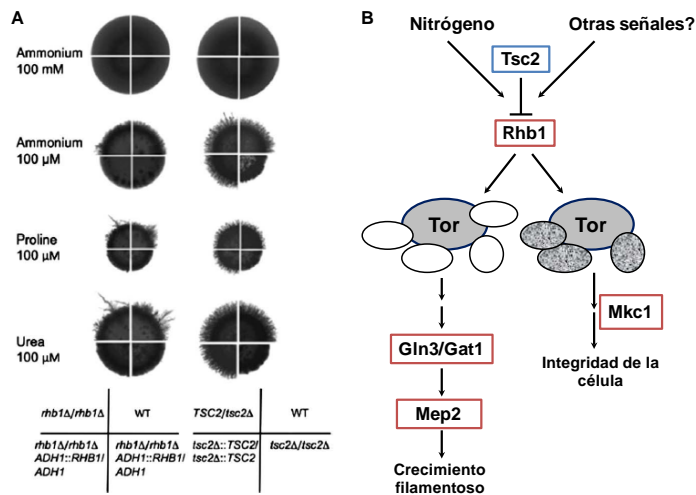


Figura 29. A. En *C. albicans*, TSC2 y RHB1 están implicados en el crecimiento filamentoso inducido por hambre de nitrógeno. **B.** Modelo de la vía de señalización de Tsc2/Rhb1/TOR y su papel en la morfogénesis y la integridad celular en respuesta a hambre de nitrógeno (Tsao *et al.*, 2008).

2. Resultados

2.1. Los supuestos transportadores de aminoácidos SCL1A5 y SLC7A5

2.1.1. Identificación y características de SCL1A5 y SLC7A5 de *F. oxysporum*

En este trabajo se han identificado los genes *slc1A5* y *slc7A5* como responsables de supuestos transportadores de aminoácidos, mediante el análisis *in sillico* del genoma de *F. oxysporum* (Números de accesos: FOXG_00582 y FOXG_00582, respectivamente). Con las secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 (Figura 30A y C), se generaron modelos teóricos tridimensionales con el programa “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006), que mostraron una gran similitud con las estructuras secundarias de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de *D. melanogaster* (Figura 30B y D). Además la utilización del motor informático PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>), reveló que las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de *F. oxysporum* son proteínas transmembranales multipaso, que atraviesan la membrana mediante sucesivas α -hélices (Figura 31A y B).

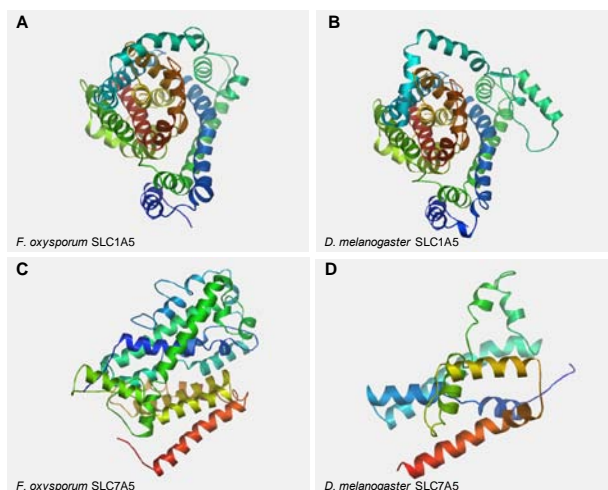


Figura 30. Modelo tridimensional teórico de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de *F. oxysporum* (A y C) y de *D. melanogaster* (B y D). Se representan las estructuras secundarias de las proteínas con las α -hélices y las láminas β . Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006).

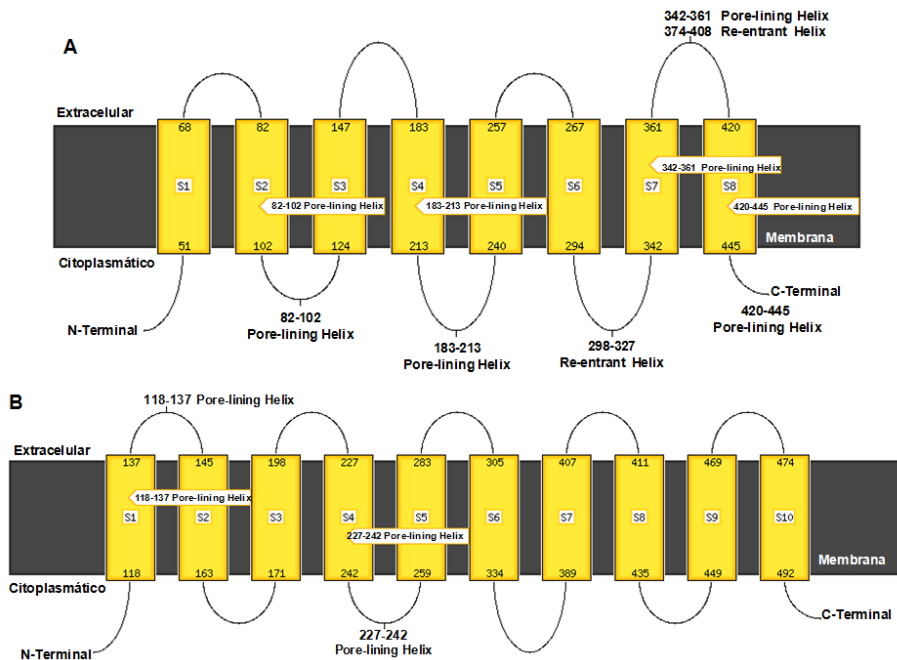


Figura 31. Predicción de la topología transmembrana de las proteínas SLC1A5 (A) y SLC7A5 (B) de *F. oxysporum*. Los modelos fueron generados utilizando el motor informático PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas SLC1A5 y SLC7A5 con las de otras proteínas SLC1A5 y SLC7A5 de distintas especies fúngicas y otros organismos mostró la mayor identidad con los ortólogos de *F. verticillioides* (94,3 % y 77,2%, respectivamente) y la menor con los de *M. oryzae* (57,2 %) y *A. fumigatus* (50,1 %), mientras que con otros organismos la identidad fue baja como es el caso de SLC1A5 y SLC7A5 de *D. melanogaster* (27,5 % y 22,0 %, respectivamente). SLC1A5 y SLC7A5 de *F. oxysporum* contienen las secuencias conservadas de los motivos “pore-lining Hélix”, las α -hélices de transmembrana y las posibles regiones extracelulares (Figura 32 y 33).

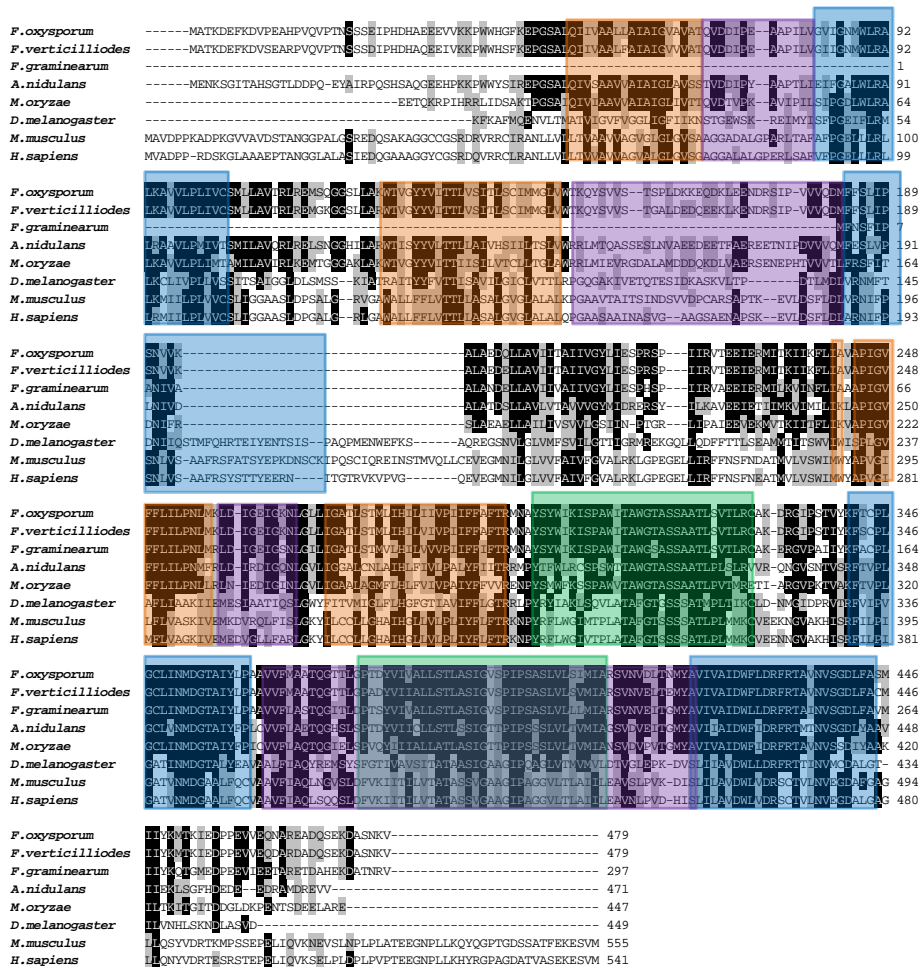


Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SLC1A5. SLC1A5 de *F. oxysporum* se alineó con las proteínas ortólogas de *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *M. oryzae*, *A. nidulans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* y *H. sapiens*. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y aquellos que tienen características similares en gris (Alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* y *Lasergene*). La posición de "pore-lining Hélix" se indica sombreada en azul, en verde "Re-entrant Helix", en naranja se indica los pasos de las α -hélices de transmembrana y en morado se indican las posibles regiones extracelulares.

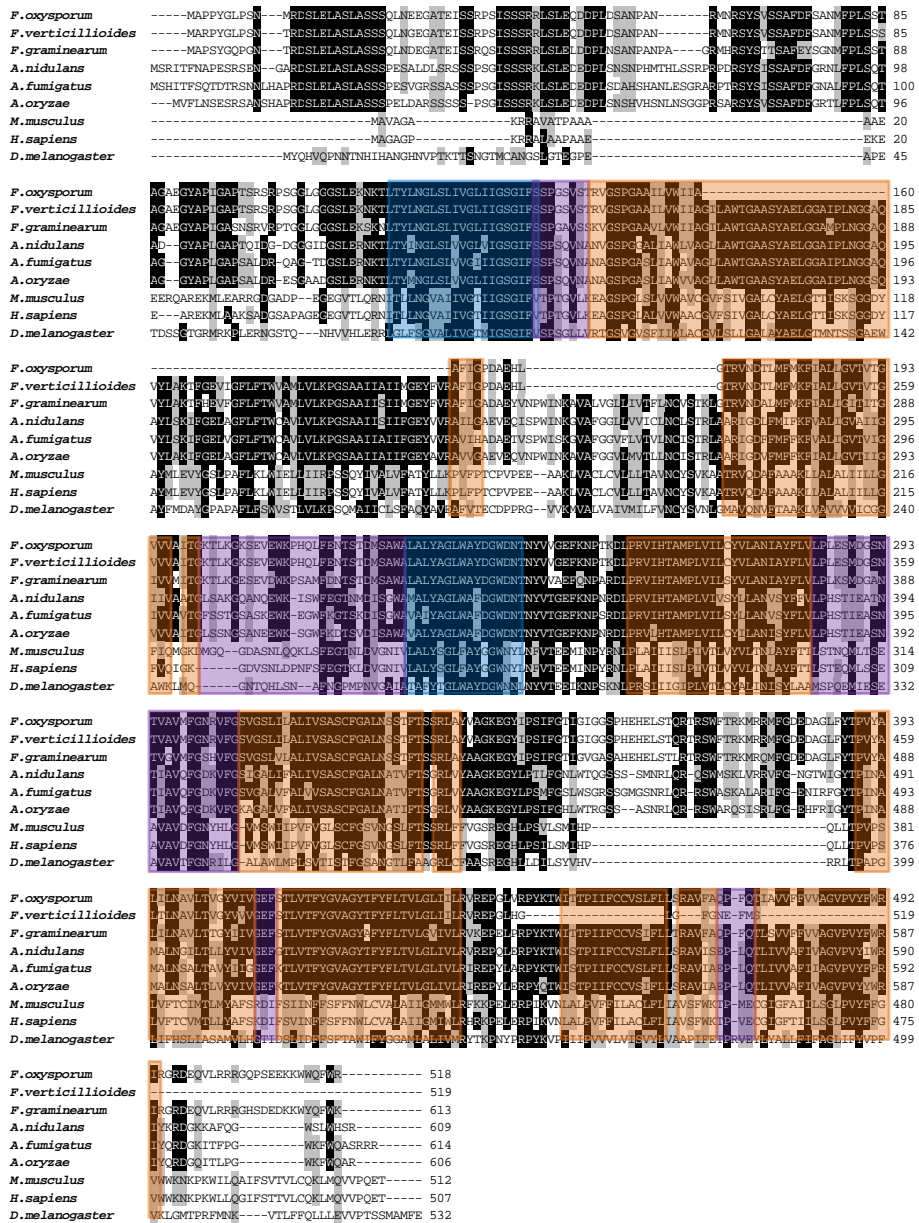


Figura 33. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SLC7A5. SLC7A5 de *F. oxysporum* se alineó con las proteínas ortólogas de *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *M. musculus*, *H. sapiens* y *D. melanogaster*. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y aquellos que tienen características similares en gris (Alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* y *Lasergene*). La posición de "pore-lining Hélix" se indica sombreada en azul, en naranja se indica los pasos de las α -hélices de transmembrana y en morado se indican las posibles regiones extracelulares.

2.1.2. Interrupción dirigida de *slc1A5* y *slc7A5*

Estudios previos en células de mamíferos mostraron que la absorción de L-glutamina está mediada por el transportador de alta afinidad SLC1A5, y que la pérdida de función de SLC1A5 inhibe el crecimiento celular mediado por TOR, activando la autofagia. Por otro lado, SLC7A5 es un transportador bidireccional que controla la salida simultánea de glutamina y la entrada de leucina en la célula, resultando en la activación de TOR via Rag (Nicklin *et al.*, 2009).

En este trabajo se planteó estudiar el papel de los genes *slc1A5* y *slc7A5* de *F. oxysporum*, que codifican supuestos transportadores de aminoácidos ortólogos a SLC1A5 y SLC7A5 de mamíferos. Para ello se generaron mutantes nulos en los cuales se reemplazó la fase codificante completa de los genes por el casete de resistencia a higromicina B. Se analizaron 15 y 20 transformantes resistentes a higromicina, respectivamente, por PCR con una combinación de cebadores específicos (Figura 34A y 35A).

En tres y cuatro de los transformantes, respectivamente, se amplificaron fragmentos que indicaron que la construcción de disrupción se había insertado de forma homóloga en la región de interés. Mediante análisis *Southern* se observó el reemplazamiento de fragmentos *Pst*I de 19.3 kb y 10.4 kb de los alelos *slc1A5* y *slc7A5* silvestres, respectivamente, por otros de 15.2 kb y 6.0 kb, respectivamente, demostrando que estos transformantes, llamados Δ *slc1A5* y Δ *slc7A5*, respectivamente, portan una copia interrumpida del gen (Figuras 34 y 35)

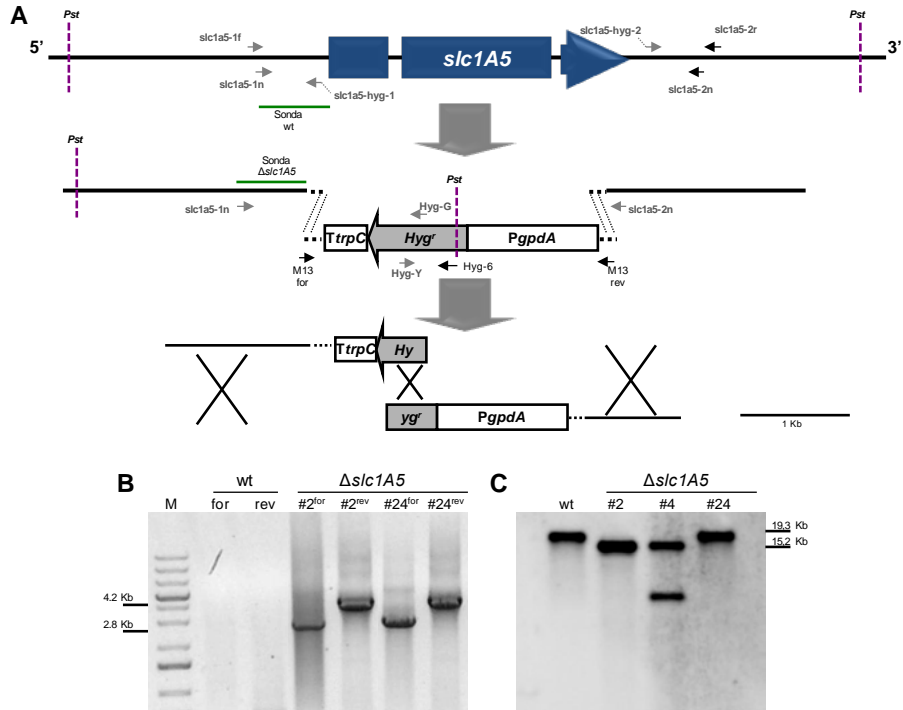


Figura 34. Generación de un mutante Δ nulo *slc1A5* en *F. oxysporum*. (A) Representación esquemática del gen *slc1A5* y de la construcción para su inactivación. (B) Análisis de los transformantes mediante PCR utilizando los cebadores específicos *slc1a5-1f* + *hyg-6* y *slc1a5-2r* + *hyg-Y*. (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; los ADNg de la cepa silvestre y de los transformantes fueron tratados con la enzima de restricción *Pst*, separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con las sondas indicadas.

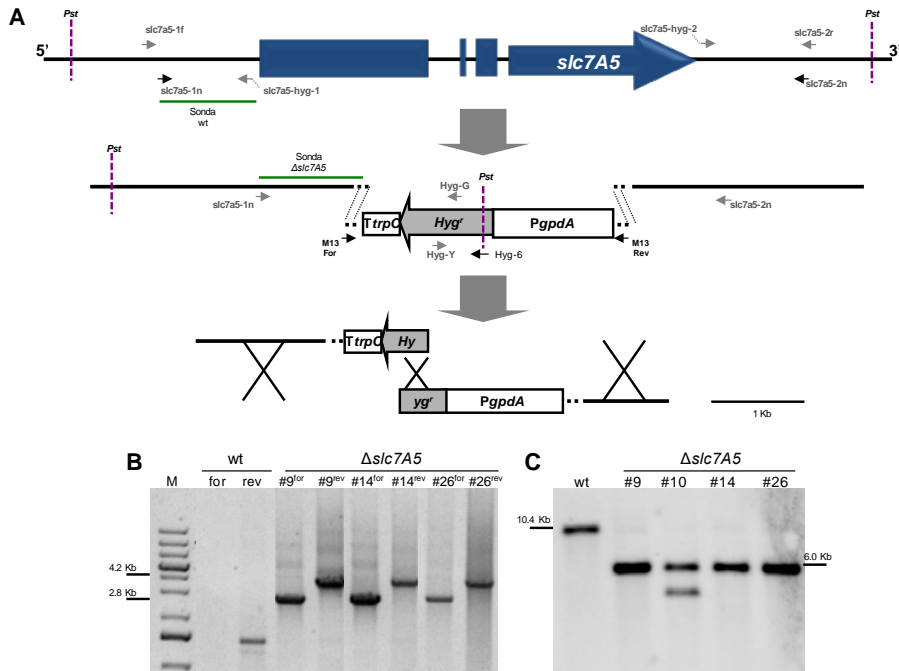


Figura 35. Generación de un mutante Δ nulo *slc7A5* en *F. oxysporum*. (A) Representación esquemática del gen *slc7A5* y de la construcción. (B) Análisis de los transformantes mediante PCR utilizando los cebadores específicos *slc7a5-1f* + *hyg-6* y *slc7a5-2r* + *hyg-Y*. (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación Southern; los ADNg de la cepa silvestre y de los transformantes fueron tratados con la enzima de restricción *PstI*, separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con las sondas indicadas.

2.1.3. Crecimiento y desarrollo de los mutantes Δ *slc1A5* y Δ *slc7A5*

El crecimiento de los mutantes Δ *slc1A5* y Δ *slc7A5* en placas con MM suplementado con las fuentes de nitrógeno inorgánicas NaNO_3 y NH_4NO_3 sin o con rapamicina fue similar al de la silvestre (Figura 36). Sin embargo, en $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$, las cepas mutantes presentaron una reducción leve del tamaño de la colonia con respecto a la estirpe silvestre.

Posteriormente, se evaluó, si los mutantes Δ *slc1* y Δ *slc7* estaban afectados en la utilización de los aminoácidos glutamina o leucina. No se observaron diferencias en el fenotipo de las colonias entre la cepa silvestre y los mutantes en MM suplementado con casaminoácidos o glutamina.

Sin embargo, en medio MM suplementado con leucina, las cepas mutantes presentaron una reducción leve en el tamaño de la colonia y la ramificación de las hifas en comparación con la estirpe silvestre (Figura 37).

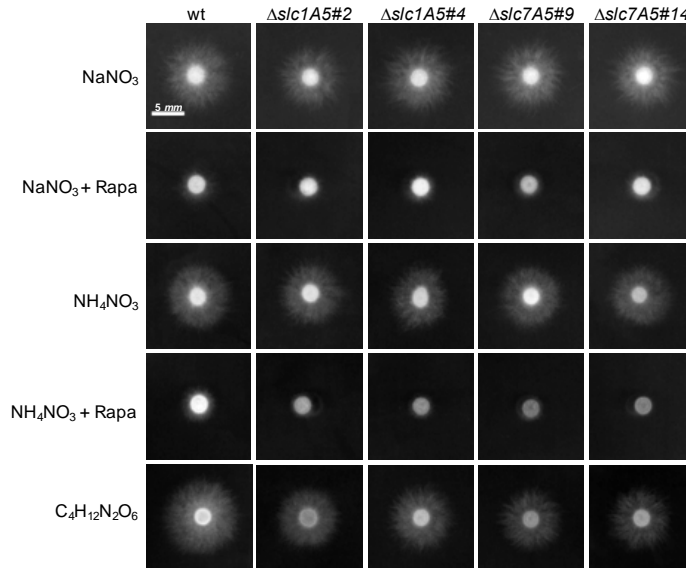


Figura 36. Fenotipo de la colonia. La cepa silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$ creciendo en medio mínimo suplementado con 25 mM de las fuentes de nitrógeno indicadas, en la ausencia o presencia de rapamicina (Rapa). Las placas fueron inoculadas con 2×10^4 microconidios, incubadas durante 3 días a 28°C y escaneadas.

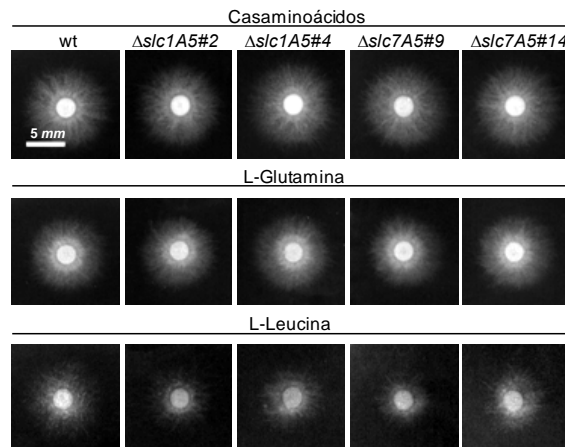


Figura 37. Fenotipo de colonia. La cepa silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$ en medio mínimo suplementado con 1% de Casaminoácidos, 10 mM de L-Glutamina ó 10mM de L-Leucina. Las placas fueron inoculadas con 2×10^4 microconidios, incubadas durante 3 días a 28°C y escaneadas.

2.1.4. Funciones asociadas con la virulencia: fusión de hifas y crecimiento invasivo

Los microconidios de las cepas mutantes de $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc7A5$ germinados en nitrato de sodio formaron una red de agregación menos densa que la estirpe silvestre (Figura 38). En presencia de amonio no se formó dicha red en ninguna de las cepas ensayadas. La agregación de hifas fue revertida parcialmente en presencia de rapamicina.

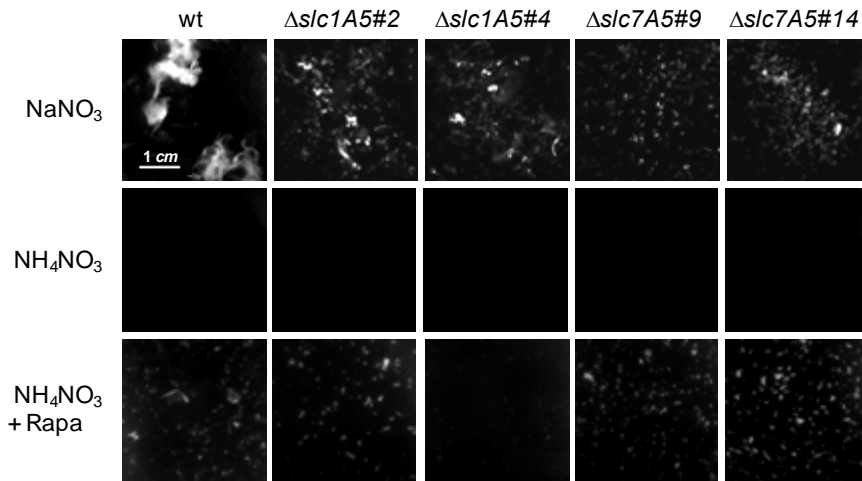


Figura 38. Agregación de hifas. Cultivos de las cepas indicadas fueron incubados 24 horas a 28°C en PDB diluido 50 veces y suplementado con 25mM de la fuente de nitrógeno indicada, en ausencia o presencia de rapamicina (Rapa). Los cultivos fueron vortexeados para disgregar las uniones débiles y observadas bajo una lupa binocular. La barra de escala equivale a 1 cm.

La penetración de celofán de la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta slc1A5$ en nitrato de sodio fue similar, mientras los mutantes $\Delta slc7A5$ fueron ligeramente menos invasivos (Figura 39). La penetración fue anulada en presencia de amonio, y se restableció en todas las cepas mediante la adición de rapamicina.

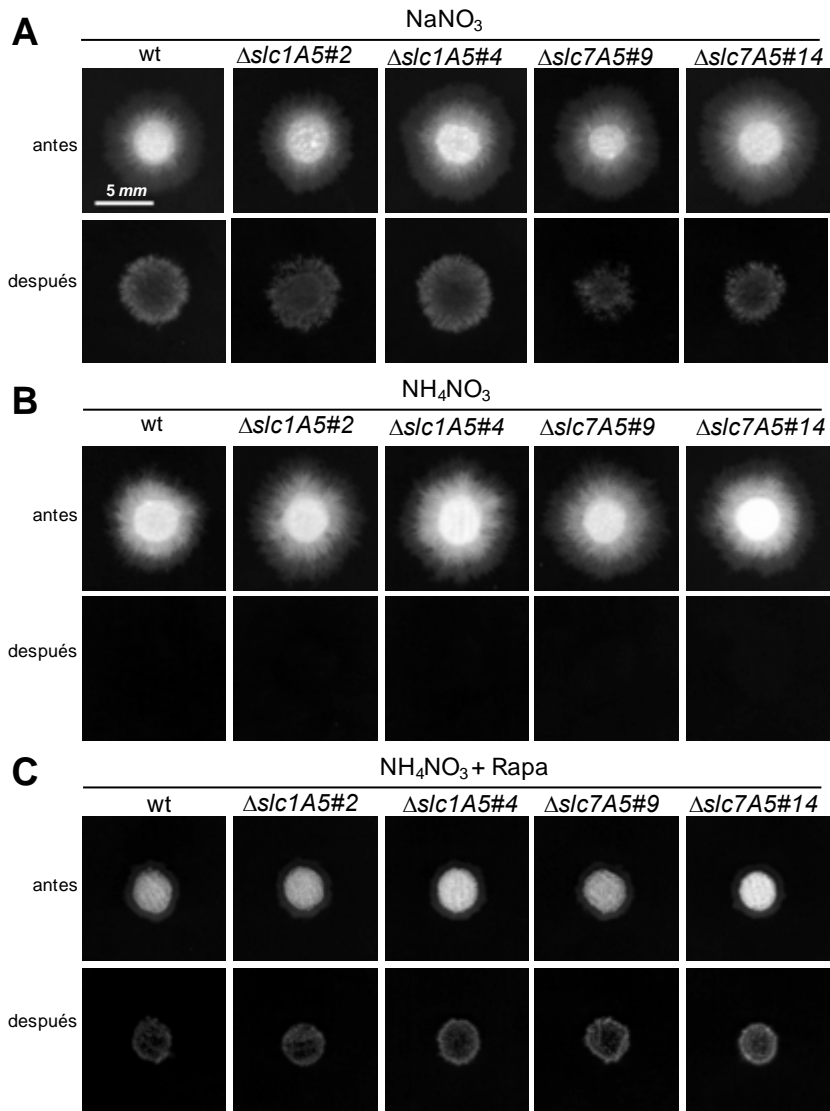


Figura 39. El ensayo de penetración de celofán, fue realizado y evaluado como se describe en la Figura 17, con las cepas mutantes $\Delta\text{slc1A5}\#2$, $\Delta\text{slc1A5}\#4$, $\Delta\text{slc7A5}\#9$, $\Delta\text{slc7A5}\#14$ en los medios indicados (A-C).

También se estudió el papel de SLC1A5 y SLC7A5 en la invasión de cortes de manzana. Los mutantes Δslc1A5 causaron algo más de maceración que la estirpe silvestre, mientras que los mutantes Δslc7A5 mostraron un fenotipo ligeramente menos invasivo (Figura 40).

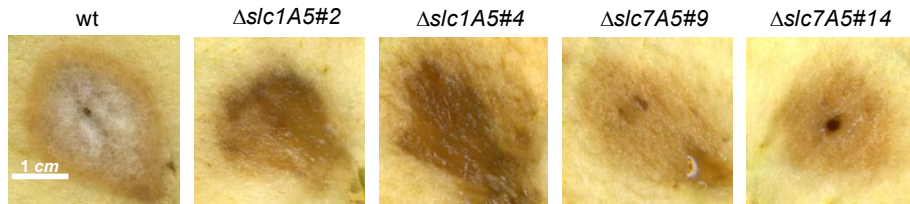


Figura 40. Ensayo de infección en cortes de manzana. Se inocularon con 5×10^4 microconidios de las cepas indicadas y se incubaron a 28°C. La invasión y maceración del tejido se evaluaron a los 4 días de la inoculación.

2.1.5. SLC1A5 y SLC7A5 contribuyen a la virulencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate y en *G. mellonella*

Las plantas de tomate inoculadas con las cepas mutantes $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc7A5$ mostraron un claro retraso en los síntomas de enfermedad en comparación con la estirpe silvestre (Figura 41).

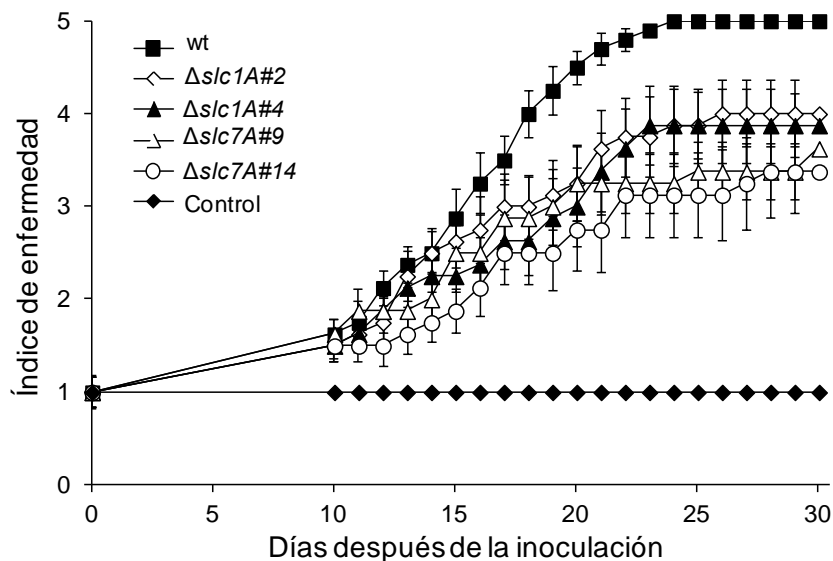


Figura 41. Virulencia de las estirpes de *F. oxysporum* sobre las plantas de tomate. Las raíces de las plantas fueron inoculadas con la estirpe silvestre (wt) o las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$ y los síntomas de enfermedad fueron evaluados en una escala de 1 (planta sana) a 5 (planta muerta). Las barras de error indican el error estándar calculado a partir de 10 plantas por cada experimento.

El 55% de las plantas inoculadas con las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$ sobrevivieron al experimento, observándose diferencias significativas en la mortalidad entre los mutantes y la cepa silvestre ($P = 0,0291$; $P = 0,0294$; $P = 0,0070$; $P = 0,0017$, respectivamente), pero no entre las distintas cepas mutantes (Figura 42).

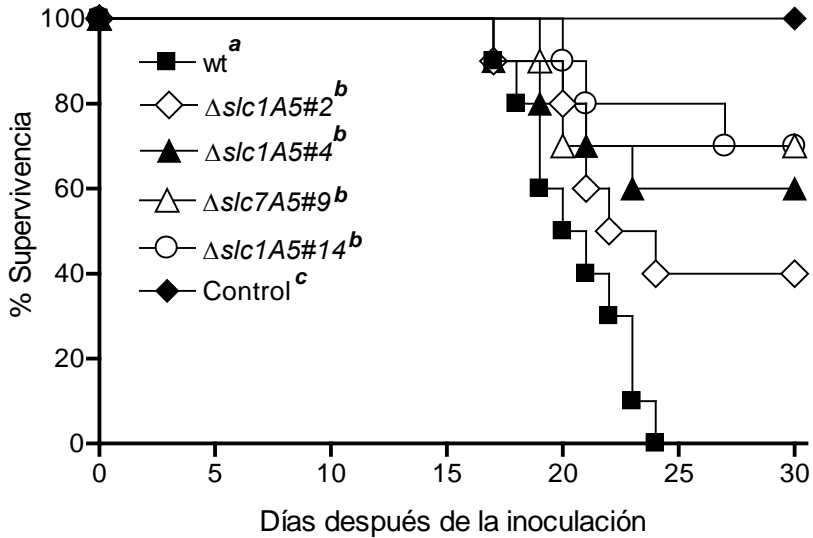


Figura 42. Mortalidad de las plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$. Grupos de 10 plantas fueron inoculadas con las cepas indicadas y el porcentaje de supervivencia fue representado. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

La mortalidad de larvas de *G. mellonella* causada por los mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$ fue significativamente inferior a la causada por la estirpe silvestre ($P < 0,0001$) (Figura 43). No se observaron diferencias significativas entre las distintas cepas mutantes.

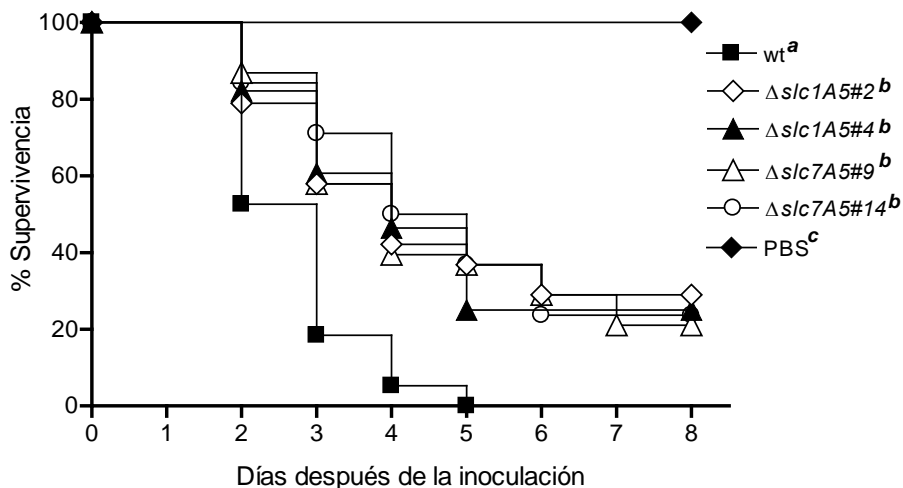


Figure 43. Mortalidad de larvas de *G. mellonella* inoculadas con la estirpe silvestre (wt) y las cepas mutantes $\Delta slc1A5\#2$, $\Delta slc1A5\#4$, $\Delta slc7A5\#9$ y $\Delta slc7A5\#14$. Grupos de 15 larvas fueron inoculadas por inyección con 1×10^4 microconidios de las cepas indicadas e incubadas a 30 °C. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 8 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

2.2. La GTPasa Gtr1 y la proteína Tsc2

2.2.1. Identificación y características de Gtr1 de *F. oxysporum*

Los gen *gtr1* y *gtr2* de *F. oxysporum* fueron identificados mediante el algoritmo BLASTp en la base de datos genómicos (Números de accesos: FOXG_07552 y FOXG_09460). Utilizando las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas Gtr1 y Gtr2 de *F. oxysporum* y *S. pombe* se generaron modelos de las estructuras tridimensionales teóricas de estas proteínas con el programa “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006). Las estructuras secundarias mostradas en la figura 44 resultaron ser muy similares entre ellas, con las mismas láminas β (color naranja y azul), al igual que las cadenas α -hélices (en color amarillo, celeste y verde).

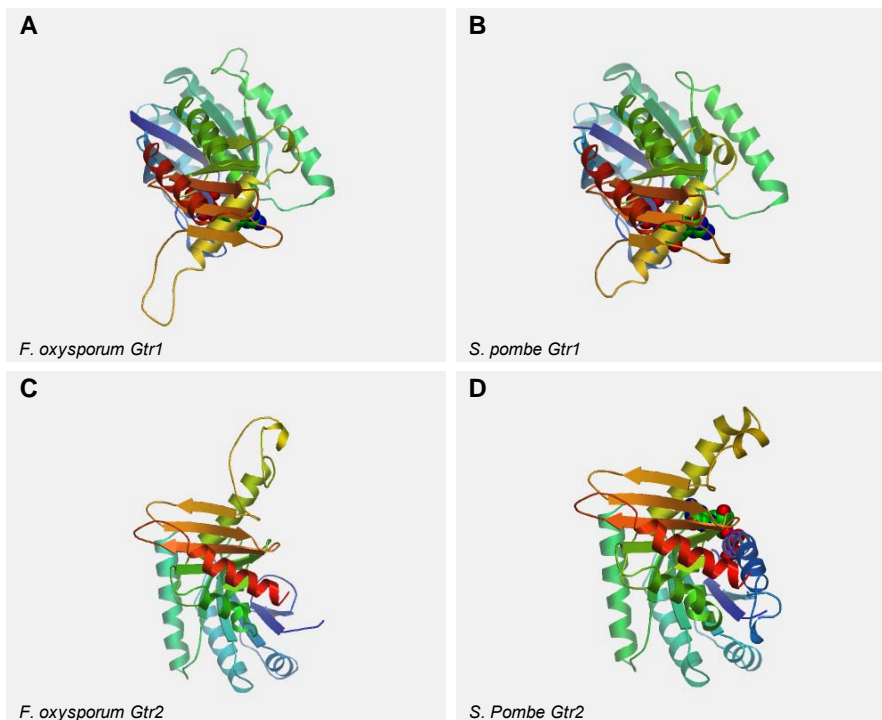


Figura 44. Modelo tridimensional teórico de las proteínas Gtr1 y Gtr2 de *F. oxysporum* (A y C) y de *S. pombe* (B y D). Se representan las estructuras secundarias de las proteínas con las α -hélices y las láminas β . Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático “Swiss-Model Proteomic serve” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006).

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Gtr1 y Gtr2 de *F. oxysporum* y de diversas especies fúngicas, así como de las proteínas Rag de *D. melanogaster* y *H. sapiens*, alineadas con Clustal W, se utilizaron para elaborar un árbol filogenético. Este indica que las proteínas Gtr1 y Gtr2 de *F. oxysporum* y de las otras especies analizadas se distribuyen en dos grupos evolutivamente diferenciados (Figura 45). El hecho de que todas las especies analizadas tengan una representación en los dos grupos y un alto grado de conservación, indican que estas proteínas han surgido de un ancestro común.

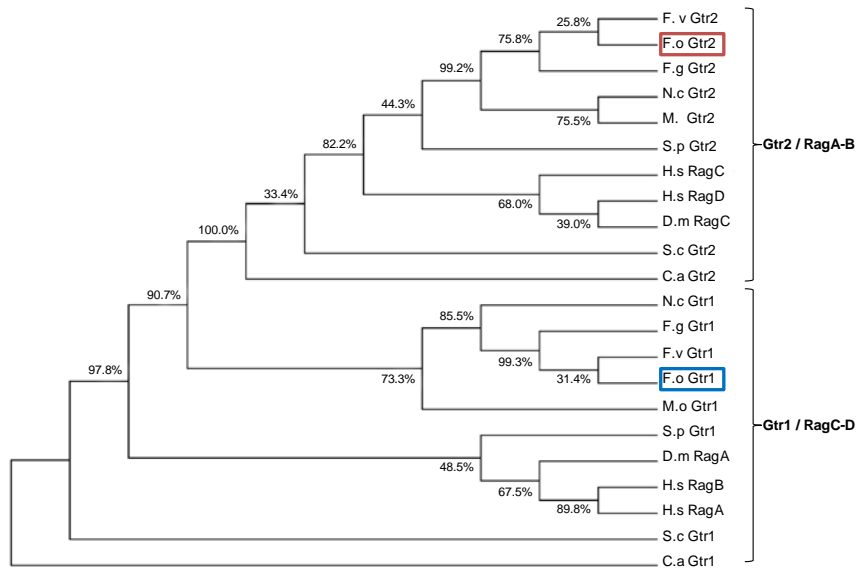


Figura 45. Relaciones filogenéticas entre las proteínas Gtr1 y Gtr2 o/y RagA/B y RagC/D de *F. oxysporum* y de otros organismos. *F.o*: *F. oxysporum*; *F.v*: *F. verticillioides*; *F.g*: *F. graminearum*; *M.o*: *M. oryzae*; *N.c*: *N. crassa*; *S.p*: *S. pombe*; *H.p*: *H. sapiens* RagA, RagB, RagC y RagD; *D.m*: *D. melanogaster* RagA y RagC; *S.c*: *S. cerevisiae* y *C.a*: *C. albicans*. El filograma se realizó con el analizador de modelos de sustitución en alineamientos *Modelgenerator* y el programa *Phyml* v 4.0 con 1000 iteraciones y se representó con *MEGA* v4.0. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas utilizando el método *Clustal W* con el programa *BioEdit*. Los valores de cada nodo representan el porcentaje de los árboles computados (“bootstrap”) basado en 1000 repeticiones de ensamblaje al azar.

La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína Gtr1 de *F. oxysporum* muestra una elevada identidad en los motivos G1 a G5 del dominio de unión de GTP de la proteína Gtr1 de *S. cerevisiae* y de diversas especies fúngicas, así como con las proteínas RagA de *D. melanogaster* y *H. sapiens* (Figura 46). Las secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína Gtr1 se compararon con las proteínas ortólogas de especies fúngicas relacionadas mediante un alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* (Hall, 1999). Dicho alineamiento mostró los porcentajes de identidad más altos con *F. verticillioides* (98.9%), *F. graminearum* (97.2%), *M. oryzae* (67.1%), *N. crassa* (62.8%), *S. pombe* (53.8%), *H. sapiens* RagA y RagB (55.4 y 55.4%, respectivamente), *D. melanogaster* (68.8%), *S. cerevisiae* (47.1%) y *C. albicans* (34.5%).

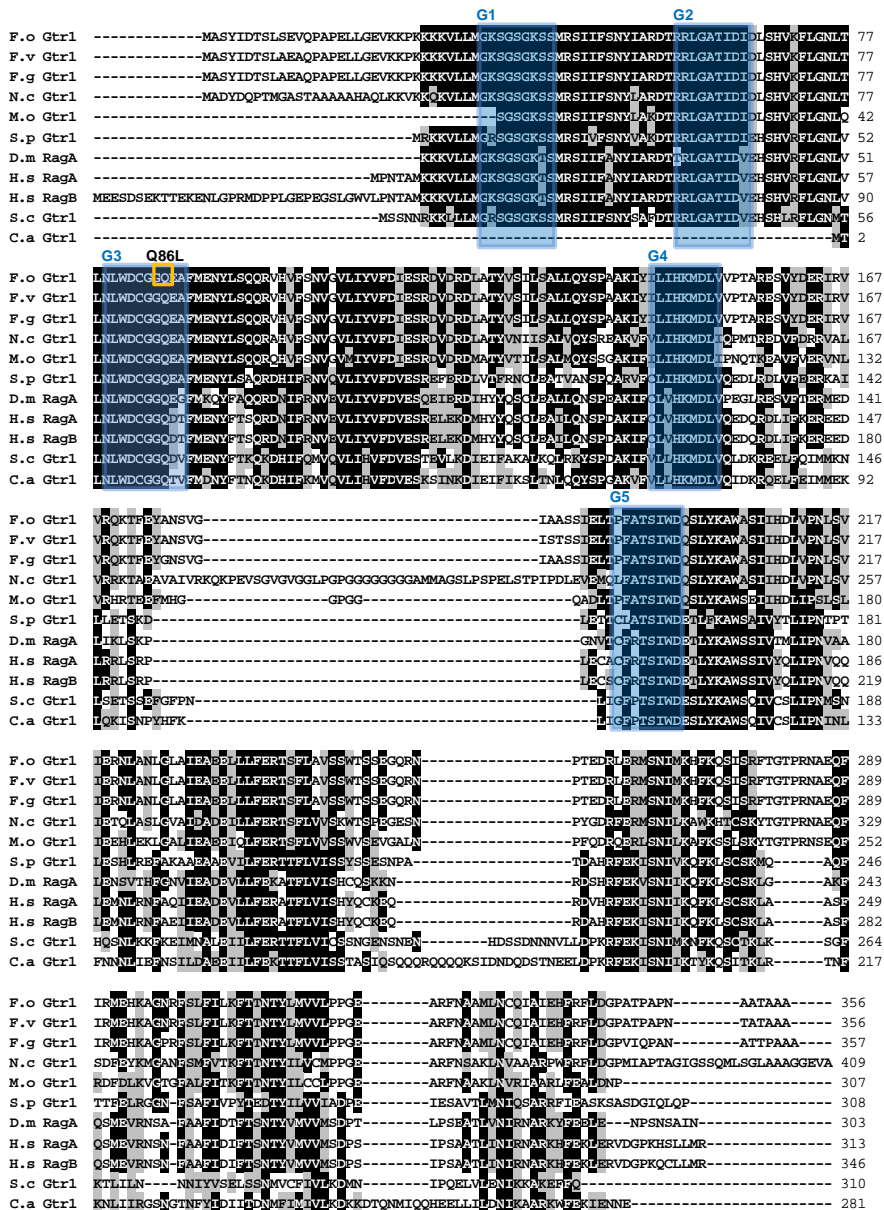


Figura 46. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Gtr1 de *F. oxysporum* con los ortólogos de otros organismos. Las proteínas de F.o, *F. oxysporum* se alinearon con proteínas Gtr1 de F.v: *F. verticillioides*; F.g: *F. graminearum*; M.o: *M. oryzae*; N.c: *N. crassa*; S.p: *S. pombe*; RagA y RagB de H.p: *H. sapiens*; D.m: *D. melanogaster*; S.c: *S. cerevisiae* y C.a: *C. albicans*. Los motivos de secuencia G1 a la G5 en el dominio de unión de GTP de la proteína Gtr1 se representan en el recuadro de color azul. Los residuos de Ser 41 y Gln 86 mutadas a Asparagina y Leucina, respectivamente en este trabajo se resaltan en recuadro de color amarillo. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y en gris aquellos que tienen características similares (Alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* y *Lasergene*).

2.2.2. Obtención de mutantes portadores de un alelo dominante activo $gtr1^{Q66L}$

En levaduras y en células humanas las proteínas Gtr/Rag funcionan como heterodímeros, consistiendo de una componente Gtr1p (RagA o RagB) y otra Gtr2p (RagC o RagD), y que interactúan con el complejo TORC1 de una manera dependiente de aminoácidos, siendo necesarios para su activación. Entre las mutaciones descritas se encuentra el cambio del aminoácido glutamina 66 por leucina (Q66L), responsable del posicionamiento y transición de la molécula GTP/GDP (Sancak *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2008). La proteína mutante Rag^{Q66L} permanece siempre unido GTP por lo que interactúa fuertemente con mTORC1, y su expresión dentro de las células hace que la vía mTORC1 se active incluso en ausencia de aminoácidos (Sancak *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2008)

Se planteó la creación de un alelo dominante activo de la proteína Rag de *F. oxysporum* por mutagénesis dirigida. Para el alelo dominante activo, se cambió un nucleótido en el codón del aminoácido 86, glutamina (CAA), por el codón leucina (CTA) (Figura 47). Para introducir este cambio, se diseñaron los cebadores específicos $gtr1\text{-}1f + gtr1^{Q86L}\text{-}6r$ y $gtr1^{Q86L}\text{-}5f + gtr1\text{-}2r$ ($gtr1^{Q86L}$) (Figura 48A y Tabla 9), donde se amplificaron dos fragmentos portadores del alelo $gtr1^{Q86L}$ de aproximadamente 2.3 kb y 1.8 kb. Una vez amplificados, los fragmentos obtenidos fueron utilizados para una fusión final por PCR. Para esta segunda PCR, se realizó la amplificación de dos fragmentos para cada construcción, utilizando los cebadores específicos $gtr1\text{-}f\text{nest}$ y $gtr1\text{-}r\text{nest}$, de modo que, cada construcción de aproximadamente 3.9 kb era portadora de los cambios realizados descritos anteriormente. Estas construcciones obtenidas se clonaron en pGEM[®]-T y se utilizaron para transformar *E. coli* DH5- α (sección Materiales y métodos 15). A partir del plásmido obtenido se amplificaron los alelos mutantes construidos con los cebadores $gtr1\text{-}f\text{nest} + gtr1\text{-}r\text{nest}$, y paralelamente se amplificó el casete de resistencia a fleomicina como descrito anteriormente. Los productos de amplificación mezclados en una proporción 3:1 ($gtr1^{Q86L}$: PhleR) se utilizaron para cotransformar protoplastos de la estirpe silvestre, y los transformantes se seleccionaron en presencia fleomicina.

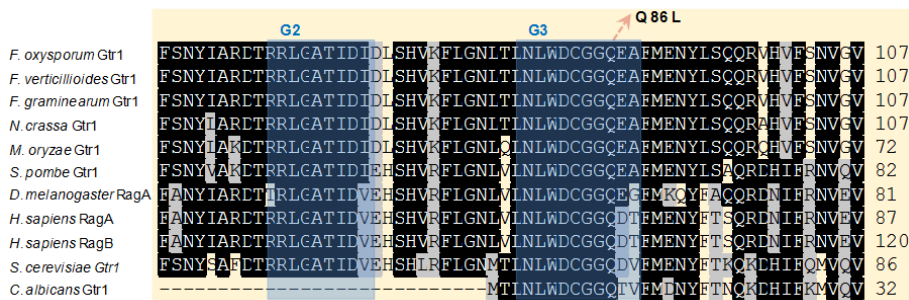


Figura 47. Comparación de proteínas Gtr1 de especies fúngicas, RagA de *D. melanogaster* y RagA/B de *H. sapiens*. En azul se muestra la zona conservada del cambio GTP/GDP resaltándose la glutamina (Q86) que sufrió el cambio por leucina (L) en el motivo G3 del dominio de unión de GTP de las proteínas Gtr,

Para la identificación de los cotransformantes portadores del alelo *gtr1*^{Q86L} entre los transformantes resistentes a fleomicina, estos se analizaron mediante amplificación por PCR a partir de ADN genómico, de un fragmento de 2.4 kb y comprobación posterior del cambio realizado de CTA por CAA (Q86L) mediante secuenciación, con los cebadores específicos *gtr1*^{S41N}-for y *gtr1* rev-sonda (Figura 48B y C). En el cromatograma de las secuencias de ADN, los cotransformantes *gtr1*^{Q86L}#9 y #10 mostraron dobles picos con alturas desiguales en las posiciones de nucleótidos mutados, probablemente debido a la presencia simultánea del alelo silvestre *gtr1* y al alelo mutado *gtr1*^{Q86L}. En cambio, la muestra de ADN del cotransformante *gtr1*^{Q86L}#1 solo presentó el pico del alelo mutado *gtr1*^{Q86L}, indicando que dicho alelo había reemplazado el silvestre en el genoma de dicho cotransformante. Para verificar si el alelo *gtr1*^{Q86L} mutado se expresa correctamente en el cotransformante *gtr1*^{Q86L}#1, realizamos un RT-PCR a partir de ARN y obtuvimos el ADNc. La secuenciación del ADNc mostró que solo estaba presente el pico correspondiente al alelo *gtr1*^{Q86L}, confirmando que el alelo mutado se expresa correctamente en dicho co-transformante (datos no mostrados).

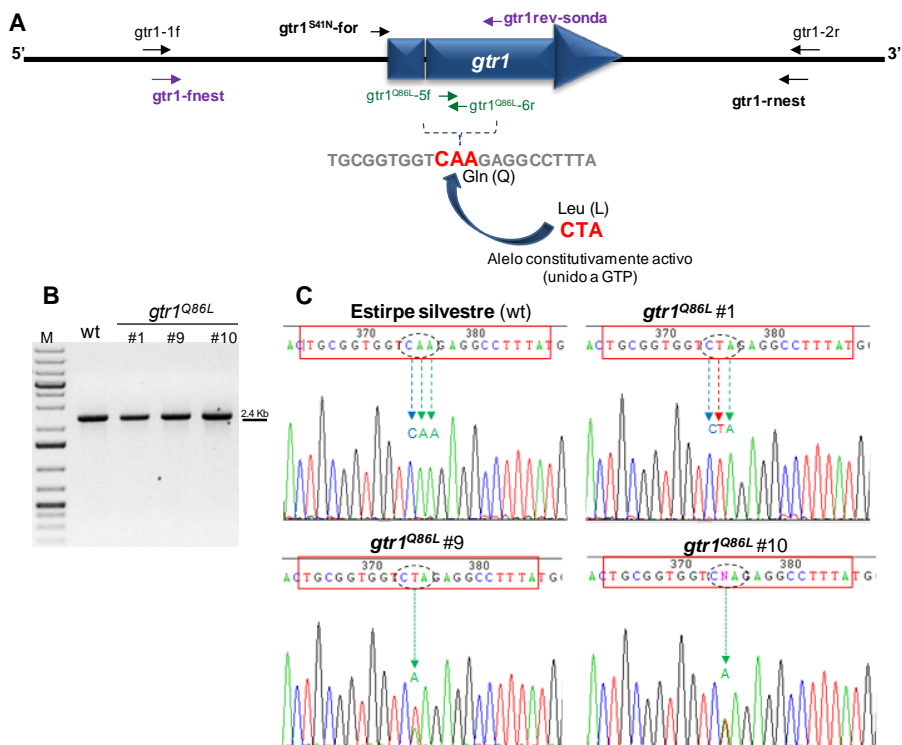


Figura 48. Representación esquemática de la generación, mediante mutagénesis dirigida, de cepas mutantes que expresan un alelo constitutivamente activo gtr1^{Q86L} de la GTPasa Gtr1 en *F. oxysporum*. (A) Posición y cambio en la secuencia de los oligonucleótidos utilizados $\text{gtr1}^{Q86L}\text{-5f}$ y $\text{gtr1}^{Q86L}\text{-6r}$. En rojo se resalta el cambio de la Gln por Leu. (B-C) Análisis de los co-transformantes mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación de un fragmento a partir de ADN genómico, utilizando los cebadores específicos $\text{ragA}^{S41N}\text{-for}$ y ragA rev-sonda. Se muestran los fluorogramas originales, indicando los nucleótidos mutados en cada cepa.

2.2.3. Identificación y características de Tsc2 de *F. oxysporum*

El gen *Tsc2* fue identificado mediante un análisis BLASTp en la base de datos genómica de *F. oxysporum* (Número de acceso: *FOXG_01632*). Utilizando las secuencias aminoacídicas deducidas de la proteína Tsc2 de *F. oxysporum*, *S. pombe* y *H. sapiens* se generaron modelos de las estructuras tridimensionales teóricas de estas proteínas con el programa “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006). Las estructuras secundarias mostradas en la figura 49 resultaron ser muy similares entre ellas, con las mismas láminas β (color azul

y verde), al igual que las cadenas α -hélices (en color rojo, azul, celeste y verde), excepto en *H. sapiens* que no presentó las mismas conformación de láminas β (indicada por una flecha amarilla).

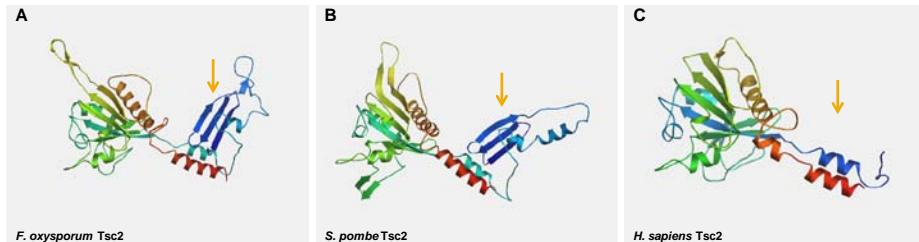


Figura 49. Modelo tridimensional teórico de la proteína Tsc2 silvestre de *F. oxysporum* y de las proteínas de *S. pombe* y *H. sapiens*. Se representa las estructuras secundarias de las proteínas con las α -hélices y las láminas β . Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático “Swiss-Model Proteomic server” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006).

F. oxysporum tsc2 codifica una proteína deducida de 1,633 aminoácidos con una elevada identidad con las de especies como *S. pombe* y *H. sapiens*. Se observa un alto grado de homología en el dominio de las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) en los ortólogos de diversas especies fúngicas, *D. melanogaster* y *H. sapiens*. En la figura 50 se muestra el alineamiento de la región que contiene el dominio GAP iniciando desde el residuo 1,278 de Tsc2 de *F. oxysporum*. Los porcentajes de identidad más altos se obtuvieron con Tsc2 de *F. graminearum* (90.0%), *F. verticillioides* (83.5%), *Nectria haematococca* (86.3%), *Metarhizium anisopliae* (69.6%), *Trichoderma reesei* (68.4%), *Neurospora crassa* (54.9%), *Magnaporthe oryzae* (55.1%). Mientras que las identidades encontradas con *A. oryzae* (39.3%), *A. fumigatus* (38.5%), *S. pombe* (33.3%), *C. albicans* (29.3%) y otros organismos como *D. melanogaster* (24.8%) y *H. sapiens* (16.6%) fueron más bajas.

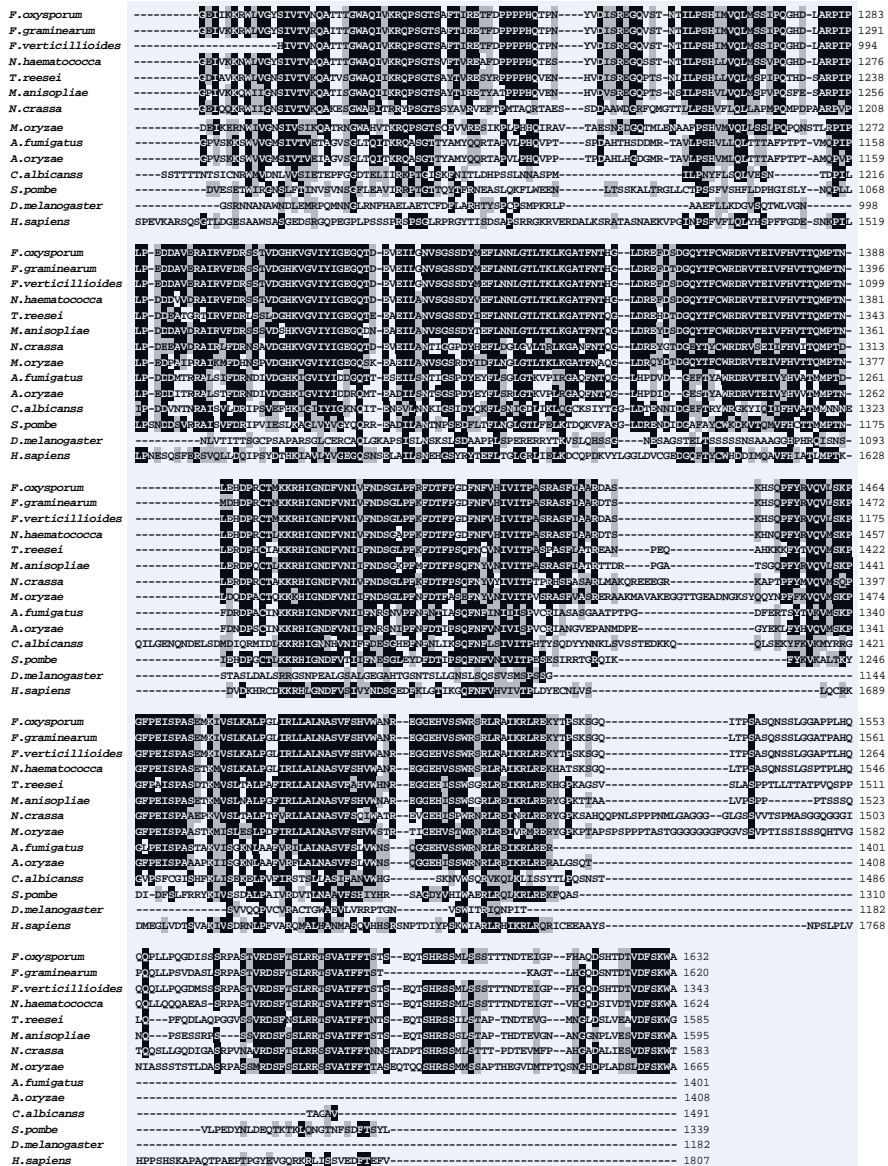


Figura 50. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Tsc2. El alineamiento muestra la predicción de las secuencias de aminoácidos del dominio GAP de las proteínas Tsc2. Las proteínas Tsc2 de *F. oxysporum* se alinearon con las proteínas Tsc2 de *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *N. haematococca*, *T. reesei*, *M. anisopliae*, *N. crassa*, *M. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *C. albicans*, *S. pombe*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y en gris aquellos que tienen características similares (Alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* y *Lasergene*).

2.2.4. Interrupción dirigida del gen *tsc2* en la estirpe silvestre y en el fondo *gtr1^{Q86L}* de *F. oxysporum*

La proteína Tsc2 inhibe la GTPasa Rheb, un activador de TOR, mediante la conversión a una forma inactiva unida a GDP (Aspuria *et al.*, 2007). En este trabajo investigamos el papel biológico del supuesto ortólogo de Tsc2 en *F. oxysporum* mediante la generación de mutantes $\Delta tsc2$. La construcción de disrupción se introdujo tanto en la cepa silvestre como en la estirpe mutante *gtr1^{Q86L}* que porta un alelo dominante activo, para estudiar las posibles relaciones epistáticas entre ambos genes. Se analizaron 20 y 15 transformantes resistentes a higromicina, respectivamente, por PCR con una combinación de cebadores específicos (Figura 51). En tres y cinco transformantes, respectivamente, se obtuvieron fragmentos que indicaron que la construcción de disrupción se había insertado de manera homóloga en la región de interés (Figura 52A). Mediante un análisis Southern se observó el reemplazamiento de un fragmento *BamHI* de 17.8 kb que corresponde al alelo *tsc2* silvestre, por otro de 9.8 kb, demostrando que estos transformantes, llamados $\Delta tsc2$ y *gtr1^{Q86L}* $\Delta tsc2$, respectivamente, portaban una copia interrumpida del gen *tsc2* (Figura 52B).

Para confirmar que el fenotipo del mutante $\Delta tsc2$ se debe únicamente a la anulación del gen, se complementó el mutante $\Delta tsc2\#6$ con el alelo silvestre. Para ello se amplificó el gen *tsc2* completo a partir del ADN genómico de la estirpe silvestre mediante PCR con los cebadores específicos Tsc2-comp y tsc2-2r (7.4 kb) y el casete de resistencia a la fleomicina (Phle^R) utilizando como molde el plásmido pAN8-1 y los cebadores universales M13-for y M13-rev. Se cotransformaron protoplastos del mutante $\Delta tsc2$ con ambos fragmentos y se seleccionaron transformantes en medio con fleomicina como agente selectivo. Se analizaron 30 transformantes resistentes a fleomicina mediante PCR con los cebadores específicos tsc2-1n y tsc2-RT2 para verificar la presencia del alelo funcional de *tsc2*. Se amplificó un fragmento de 2.5 kb, idéntico al obtenido en la cepa silvestre, en algunos de los transformantes resistentes a fleomicina, pero no en la cepa $\Delta tsc2$ (datos no mostrados). La copia del alelo *tsc2* integrada en el genoma de los cotransformantes se determinó mediante *Southern*. El ADN genómico tratado

con *Bam*HI se hibridó con la sonda utilizada previamente para analizar el mutante $\Delta tsc2$. Los transformantes complementados $\Delta tsc2+tsc2\#1$, #18, #24 mostraron una banda de hibridación adicional que no estaba presente en el mutante $\Delta tsc2$ (Figura 52B). Sin embargo, el complementado $\Delta tsc2+tsc2\#2$ mostró dos banda de hibridación, una que corresponde al alelo silvestre *tsc2* y la otra del alelo mutado presente en la cepa $\Delta tsc2$. Se le realizó un ensayo de resistencia a fleomicina y/o higromicina, en el cual el complementado $\Delta tsc2+tsc2\#2$ con doble banda mostró resistencia a ambos antibióticos y los demás complementados con una sola banda mostraron resistencia sólo a fleomicina (datos no mostrados). Se concluye, por lo tanto, que estos transformantes, denominados $\Delta tsc2+tsc2$, han integrado una copia intacta del gen *tsc2* en su genoma.

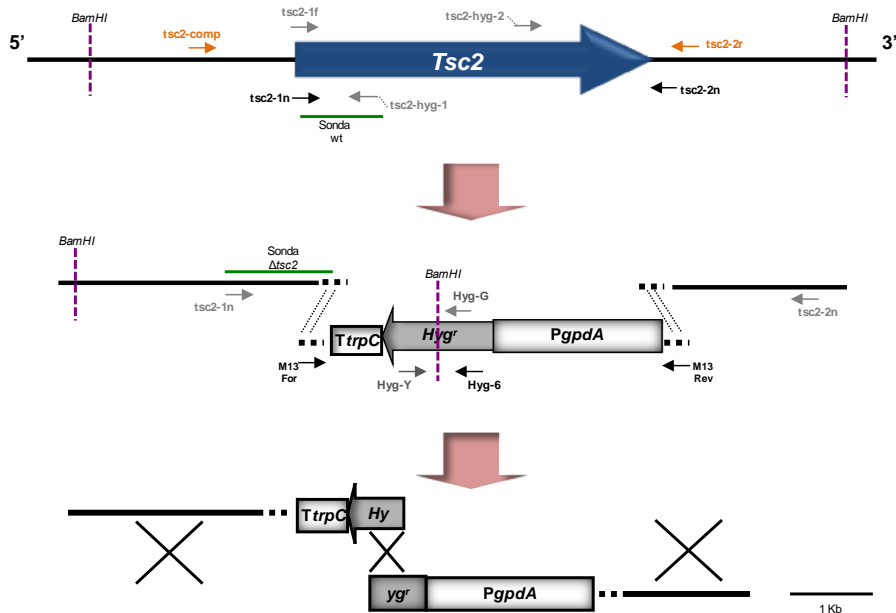


Figura 51. Generación de mutante nulos $\Delta tsc2$, la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ y dobles mutantes *gtr1^{Q86L} $\Delta tsc2$* en *F. oxysporum*. Representación esquemática del gen *tsc2* y de la construcción generada mediante PCR de fusión

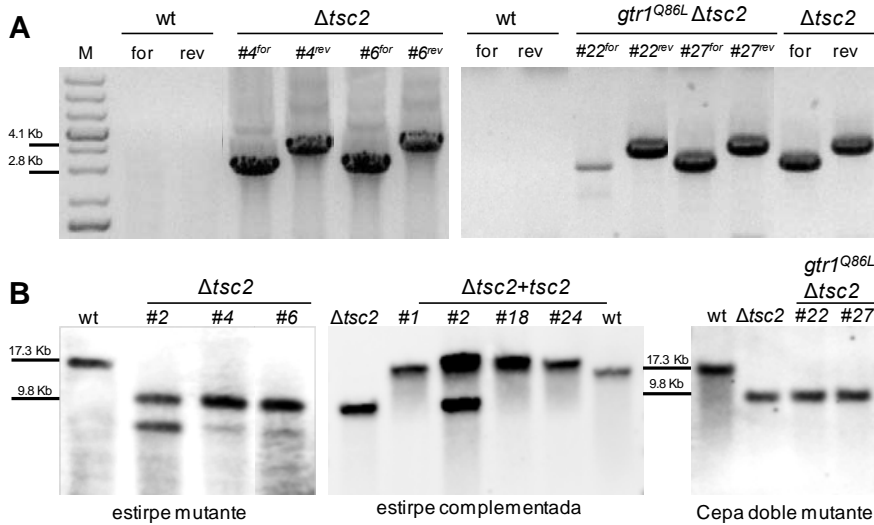


Figura 52. Análisis de mutante nulos $\Delta tsc2$, la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ y dobles mutantes $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ en *F. oxysporum*. (A) Análisis de los transformantes mediante PCR utilizando los cebadores específicos *tsc2-1f + hyg-6* y *tsc2-2r + hyg-Y*. (B) Análisis de las cepas mutantes y complementadas mediante hibridación Southern; 10 μ g de ADNg de la cepa silvestre y del transformante fueron tratados con la enzima de restricción *BamHI*, separados en un gel de 0,7% agarosa, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con la sonda indicada en (Figura 51).

2.2.5. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum*

En medio PDA, la morfología de colonias de la estirpe silvestre y la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ fueron de crecimiento muy rápido con simetría radial, la formación del micelio aéreo fue abundante de color blanco y su textura algodonosa (Figura 53). Por el contrario, las colonias de los mutantes $\Delta tsc2$ crecieron a una velocidad inferior, reduciendo dramáticamente la formación de micelio aéreo, su coloración fue de blanco a rosa y la textura lisa y menos densa en comparación al silvestre. El mutante $gtr1^{Q86L}$ mostró un fenotipo distinto, de crecimiento rápido, aunque se redujo la formación del micelio aéreo, la coloración fue de color blanco y su textura fue algodonosa, pero menos abundante que el fenotipo silvestre. Los dobles mutantes $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostraron un fenotipo muy similar al mutante $\Delta tsc2$.

Para determinar si la alteración en la morfología de las colonias está mediada por la ruta TOR se añadió rapamicina al medio, lo cual restableció el fenotipo silvestre de textura algodonosa en todas las cepas ensayadas reduciéndose, además, la velocidad de crecimiento (Figura 53).

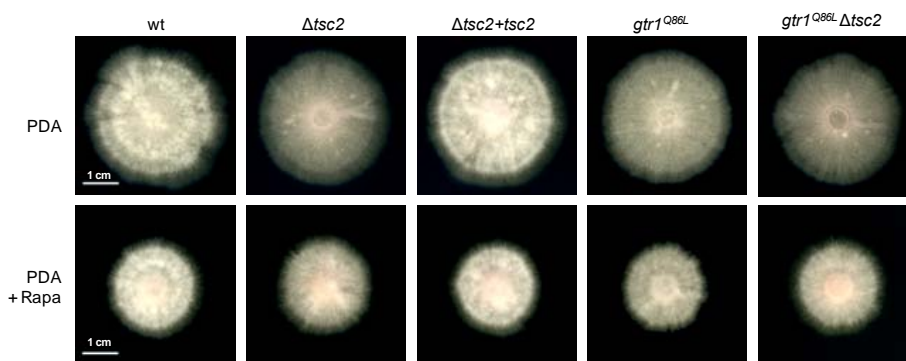


Figura 53. Morfología de la colonia. Colonias de las distintas cepas crecidas durante 5 días a 28 °C en medio PDA en la ausencia o presencia de 2 ng · ml⁻¹ de rapamicina (Rapa).

Para investigar si las cepas mutantes $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L}$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ están afectados en la utilización de distintas fuentes de nitrógeno se analizó el crecimiento de las cepas en placas con medio mínimo suplementado con 100, 50, 25 mM de NH_4Cl o con 25 mM de NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, o bien sin fuente de nitrógeno (-N). En todos los medios, las colonias de los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ redujeron dramáticamente su crecimiento y la formación de micelio aéreo, mientras que la estirpe mutante $gtr1^{Q86L}$ fue muy similar al silvestre (Figura 54).

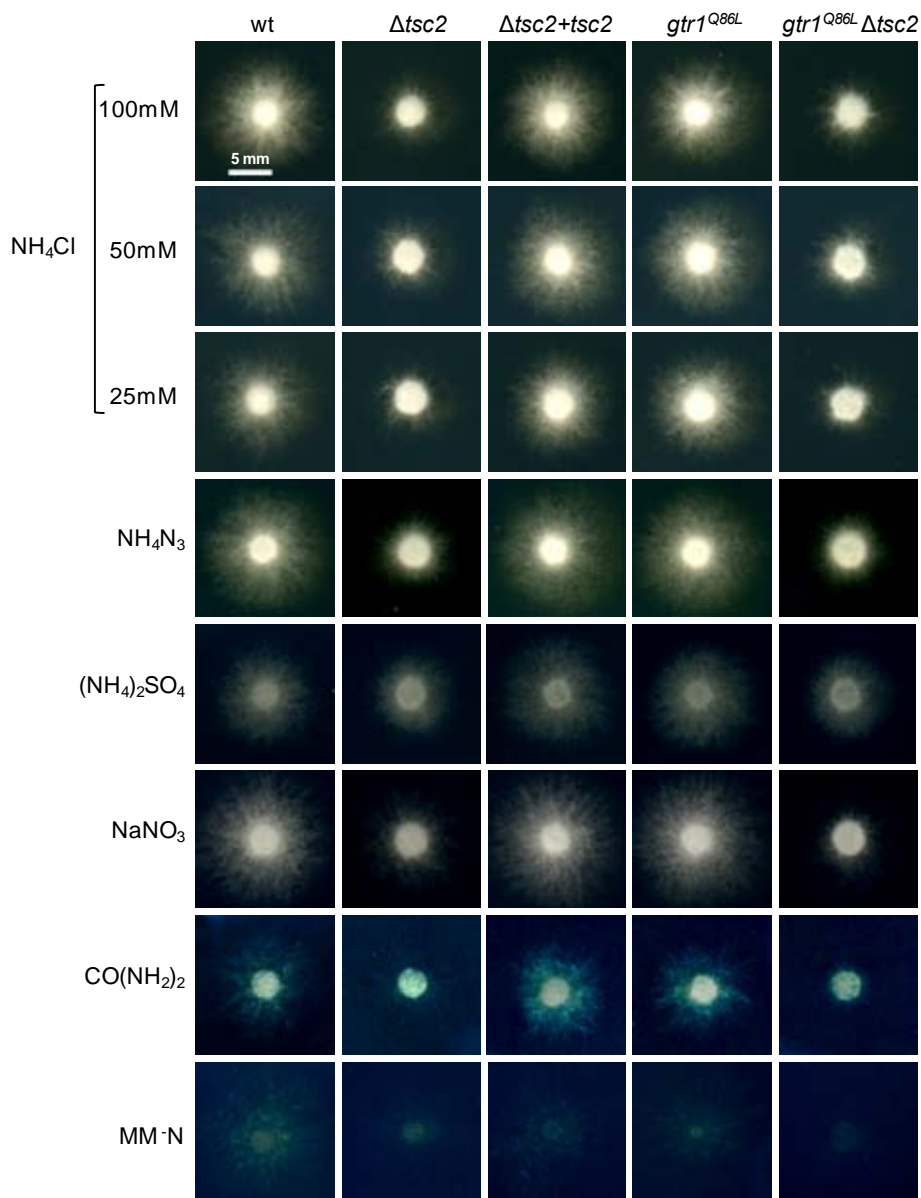


Figura 54. Morfología de la colonia en distintas fuentes de nitrógeno. Se inocularon 2×10^3 microconidios de la estirpe silvestre (wt), las cepas mutantes $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L}$, $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ y la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ en placas de medio mínimo (MM), suplementado con la fuente de nitrógeno indicada. Las placas fueron incubadas durante 3 días a 28°C y escaneadas.

Para estudiar si la fuente de nitrógeno afecta el crecimiento de hifas de las cepas mutantes $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L}$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ a través de los cambios en el pH extracelular, se examinó el crecimiento de las cepas en medio mínimo suplementado con 25 mM NH_4NO_3 ó 25 mM NaNO_3 , además para permitir el monitoreo del pH se añadió al medio los indicadores verde de bromocresol (en NH_4NO_3) o púrpura de bromocresol (en NaNO_3). La utilización de amonio causó una disminución en el pH extracelular mientras en nitrato se observó una alcalinización (Figura 55). No se observaron diferencias en el pH entre los mutantes y la estirpe silvestre.

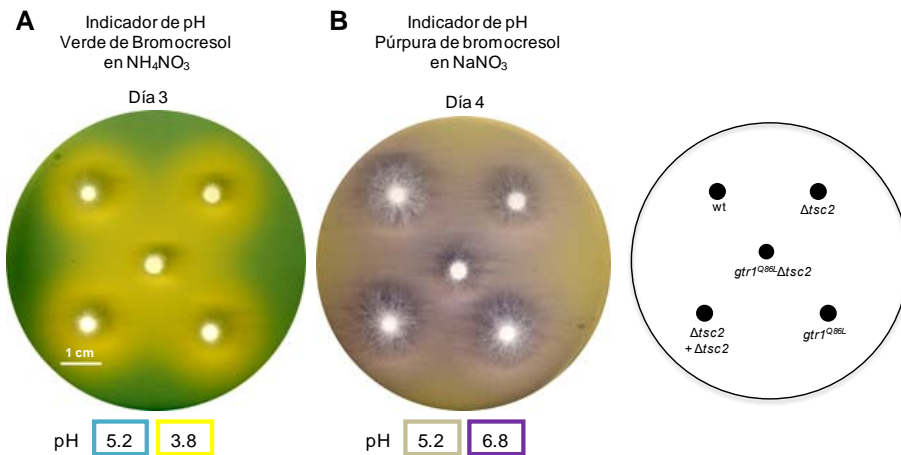


Figura 55. La reducción del crecimiento de la colonia en el mutante $\Delta tsc2$ es mediada por la fuente de nitrógeno y no por el pH. Fenotipo en medio mínimo suplementado con 25 mM NH_4NO_3 (A) ó 25 mM NaNO_3 (B). Para permitir el monitoreo del pH, se añadió los indicadores: verde de bromocresol o púrpura de bromocresol. Las placas fueron inoculadas con 2×10^3 microconidios e incubadas por 3 ó 4 días a 28 °C y escaneadas.

La GTPasa RagA está involucrada en la activación de la ruta TOR en respuesta a la señal de aminoácidos, sin embargo, la activación completa de la ruta TOR requiere la disponibilidad simultánea de aminoácidos y de factores de crecimiento (Zinzalla y Hall, 2008). Se analizó el crecimiento de las cepas en placas con medio mínimo (MM) suplementado con los siguientes aminoácidos: L-glutamina, L-ácido glutámico, L-leucina, L-cisteína, L-metionina, L-fenilalanina, L-alanina, L-ácido aspártico, L-isoleucina, L-histidina, L-serina, L-valina, L-tirosina, L-treonina, L-triptófano, L-glicina, L-

arginina, L-prolina o L-asparragina, o con 1% de casaminoácidos, en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Figuras 56).

No se observaron diferencias significativas entre las distintas cepas en casaminoácidos y en glutamina. Sin embargo en ácido glutámico, leucina, cisteína, metionina, fenilalanina, alanina, ácido aspártico, isoleucina, histidina, serina, valina, tirosina, treonina y triptófano, las colonias de los mutantes $\Delta tsc2$ y $\Delta tsc2 \text{ } gtr1^{Q86L}$ mostraron un crecimiento y un micelio aéreo fuertemente reducidos, mientras el $gtr1^{Q86L}$ creció de forma similar al silvestre. En algunos casos (L-fenilalanina, L-alanina, L-isoleucina, L-histidina, L-serina y L-valina), el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostró un fenotipo más severo que el mutante $\Delta tsc2$. En todos los casos, el fenotipo del mutante complementado $\Delta tsc2+tsc2$ resultó ser muy similar al silvestre, lo que demuestra que las diferencias observadas en los mutantes $\Delta tsc2$ son debidas a la mutación de este gen. Además, el crecimiento y la morfología de los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ se restauraba al fenotipo silvestre tras la adición de rapamicina, lo que sugiere que los fenotipos mutantes se deben a la sobreactivación de la ruta TOR (Figuras 56).

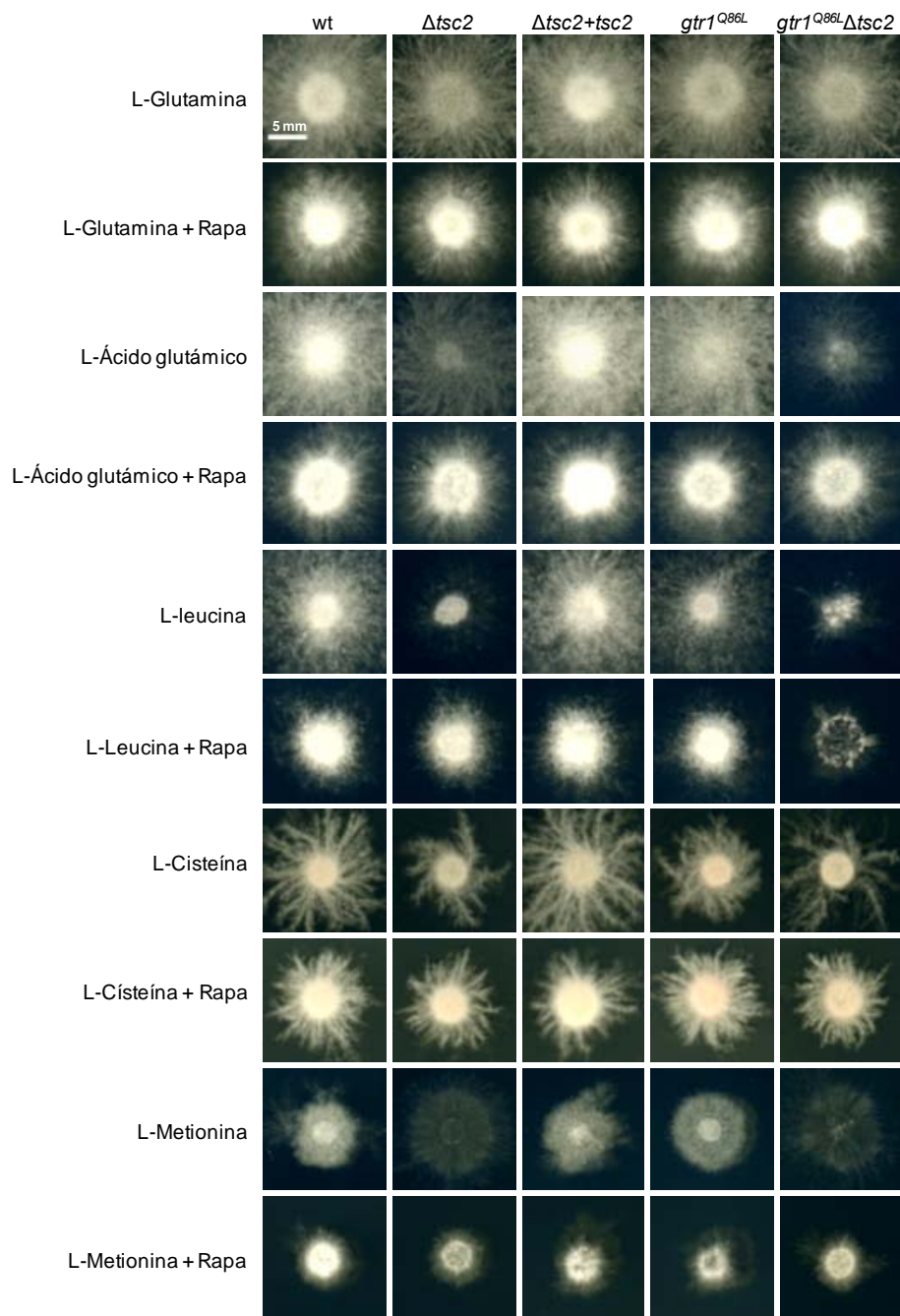


Figura 56. Continúa...

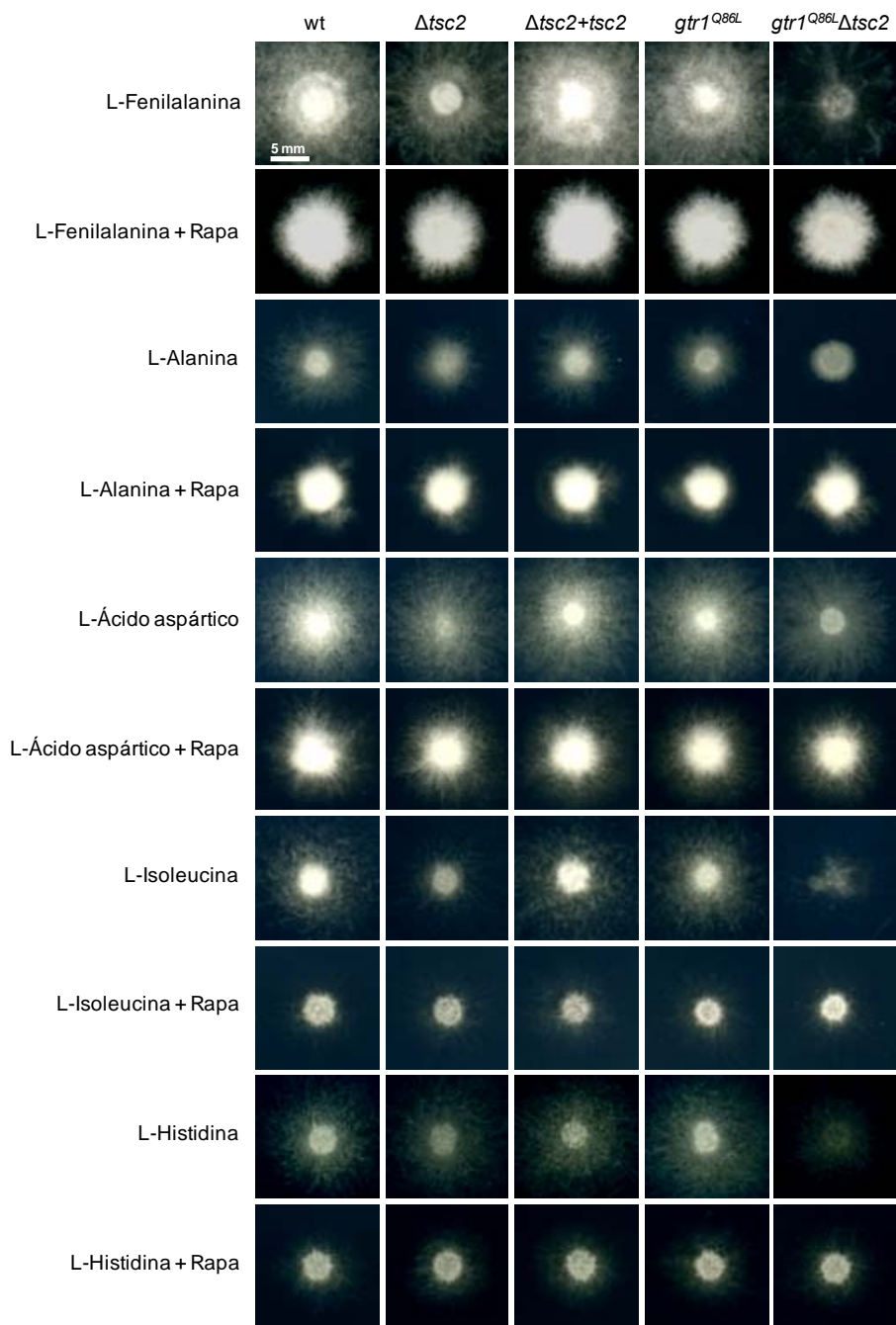


Figura 56. Continúa...

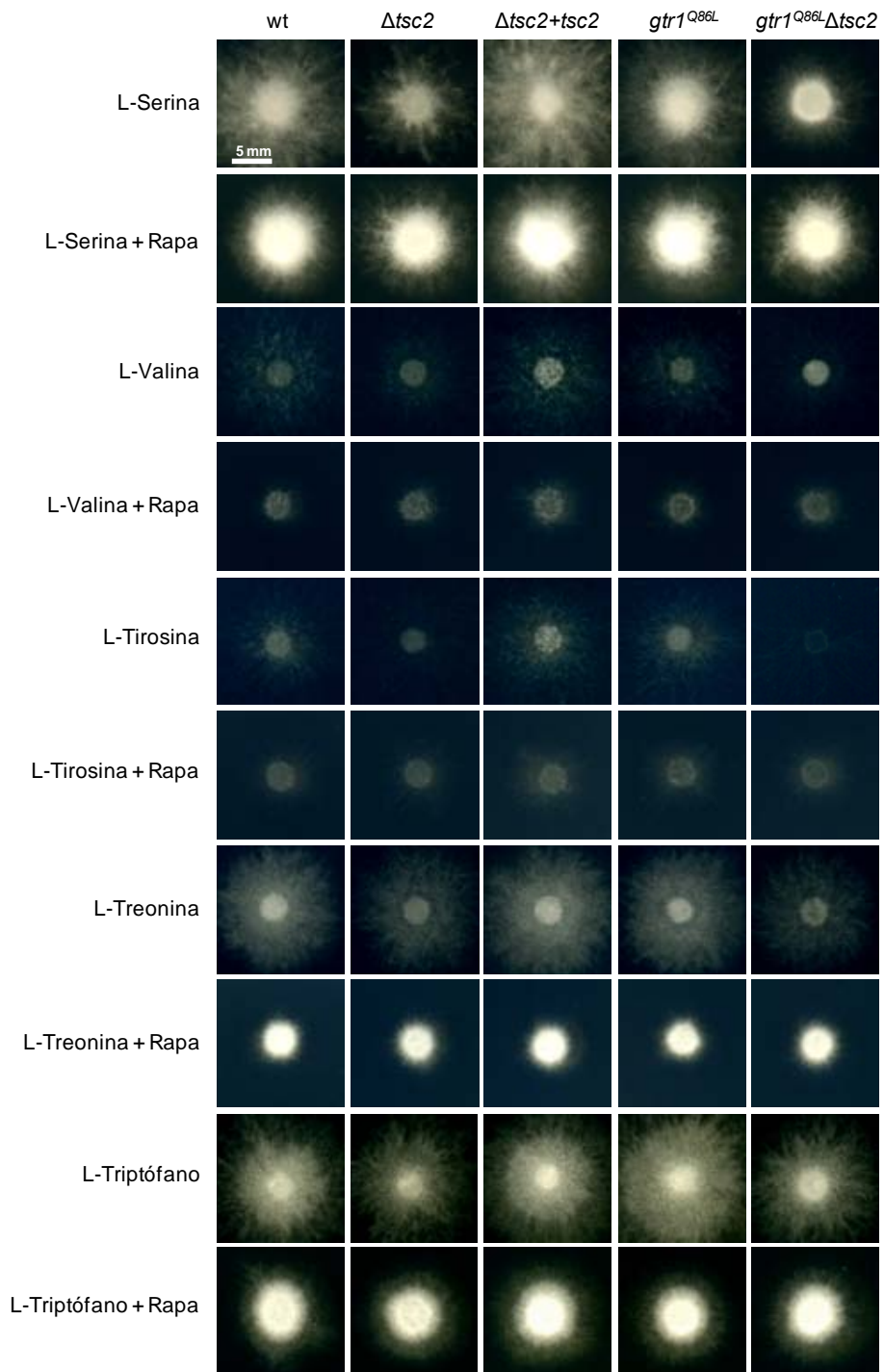


Figura 56. Continúa...

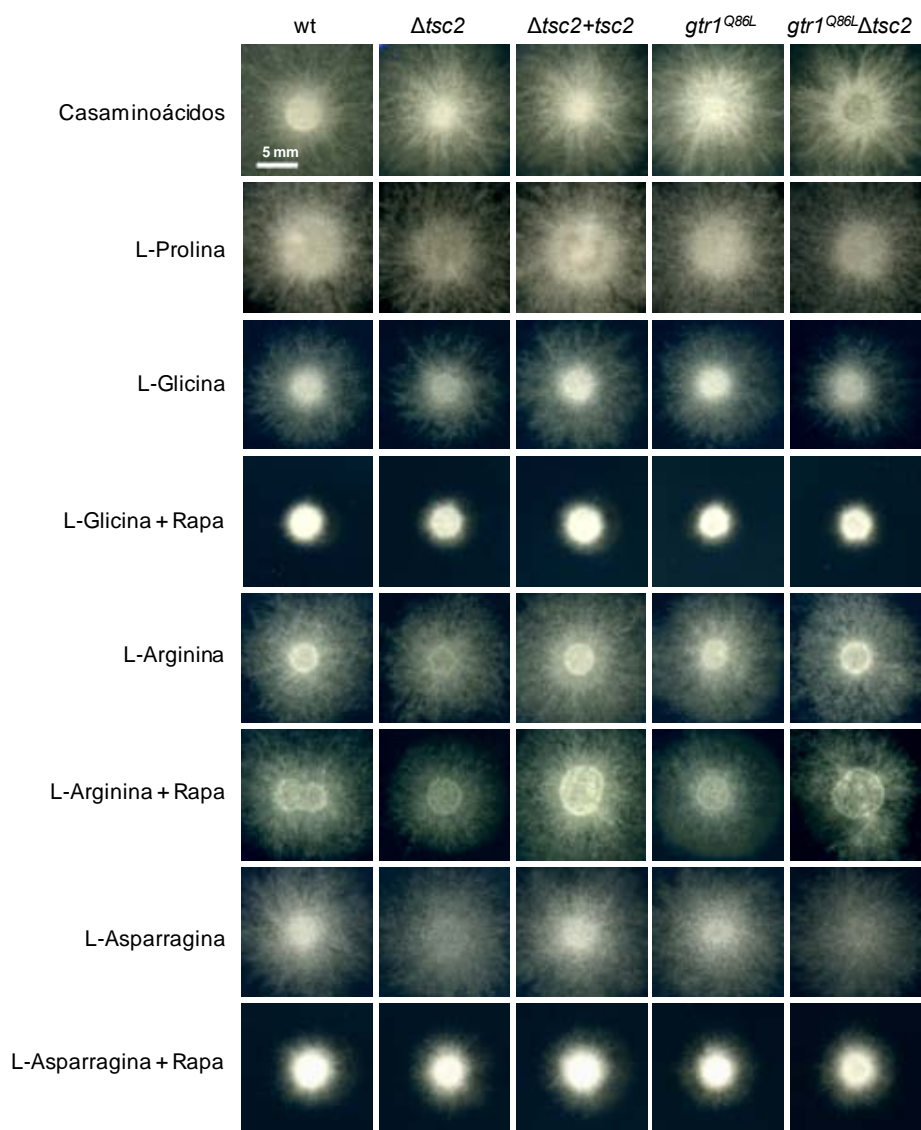


Figura 56. Morfología de la colonia en medio suplementado con distintos aminoácidos. Se inocularon 2×10^3 microconidios con las cepas indicadas creciendo en medio mínimo suplementado con 25 mM de diferentes aminoácidos indicados, en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa). Las placas fueron incubadas 4 ó 5 días a 28°C .

2.2.6. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la respuesta a estrés

Se determinó la sensibilidad de las cepas a distintos tipos de estrés. El doble mutante *gtr1*^{Q86L} Δ *tsc2* resultó ser significativamente más sensible al estrés térmico que la estirpe silvestre (Figura 57), mientras que el mutante Δ *tsc2* fue ligeramente más sensible y la cepa mutante *gtr1*^{Q86L} fue similar a la cepa silvestre. Cabe destacar que la adición de rapamicina o de sorbitol rescató el defecto de los mutantes.

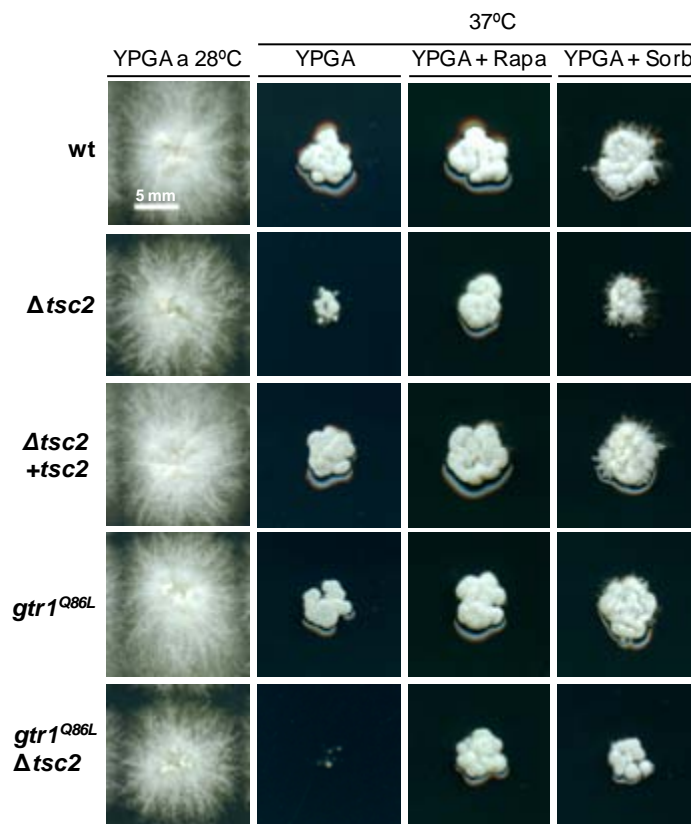


Figura 57. Sensibilidad al estrés térmico. Fenotipo de la colonia de las cepas indicadas creciendo en YPGA en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa) ó 1 M de sorbitol (Sorb). Las placas fueron inoculadas con 10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ e incubadas durante 24 horas a 28°C y después a 37°C por 4 días y escaneadas.

Por el contrario, los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ no mostraron diferencias significativas en a estrés salino y/o osmótico (1M NaCl, 1M sorbitol) u oxidativo (menadiona o peróxido de hidrógeno) (Figura 58).

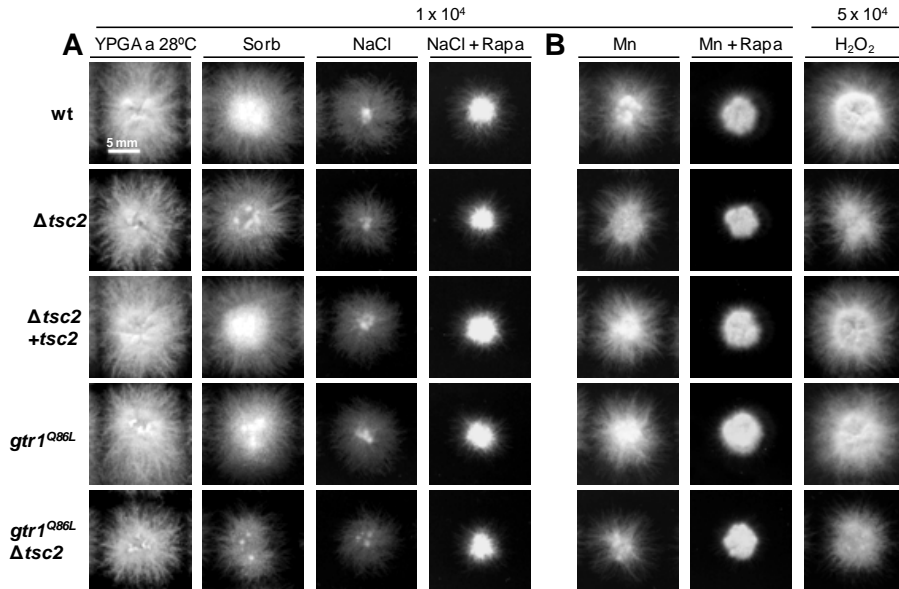


Figura 58. Sensibilidad al estrés osmótico u oxidativo. Fenotipo de la colonia de las cepas indicadas creciendo en YPGA suplementado con (A) 1 M de Sorbitol (Sorb); 1 M de NaCl en la ausencia o presencia de $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa), o (B) 0.01 % de H_2O_2 ; $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Menadiona (Mn) en ausencia o presencia de $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina. Las placas fueron inoculadas con 5×10^4 ó 10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, incubadas 3 días a 28°C y escaneadas.

Se estudió el crecimiento de las estirpes en presencia del detergente SDS, que afecta a la integridad de la membrana, así como de blanco de calcoflúor (CFW), un colorante de unión a quitina, o de rojo congo (CR), que interfiere con el ensamblado de la pared celular. El mutante $\Delta tsc2$ mostró un ligero incremento en la sensibilidad a dichos compuestos, mientras que el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostró una mayor sensibilidad el mutante sencillo $\Delta tsc2$ (Figura 59). En ambas cepas, la adición de rapamicina o de sorbitol restauró el crecimiento a niveles parecidos al silvestre. La estirpe mutante $gtr1^{Q86L}$ mostró un fenotipo muy similar a la estirpe silvestre y la cepa complementada.

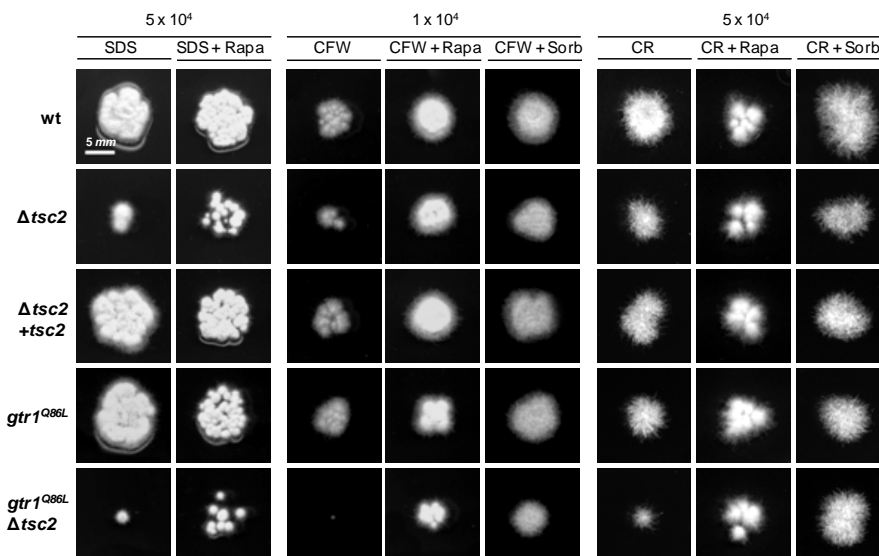


Figura 59. Sensibilidad a estrés de membrana citoplasmática o de la pared. Fenotipo de la colonia de las cepas indicadas creciendo en YPGA suplementada con 0.025% de SDS; 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de blanco de calcoflúor (CFW) y 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ rojo congo (CR) en la ausencia o presencia de 2 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa) ó 1 M de sorbitol (Sorb). Las placas fueron inoculadas con 5 x 10⁴ ó 10⁴ microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, incubadas por 3 ó 4 días a 28 °C y escaneadas.

2.2.7. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la producción de microconidios y morfología de las germínulas

La morfología de las estirpes mutantes durante la germinación y las primeras horas de crecimiento se analizó mediante la observación al microscopio de fluorescencia, en germínulas de hasta 14 horas inoculadas en medio líquido PDB en presencia o ausencia de 2 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina o en medio mínimo suplementado con 25 mM de NaNO_3 , y teñidas con CFW. En las primeras 2 horas tras la inoculación, los microconidios de la estirpe silvestre, la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ y el mutante *gtr1*^{Q86L} mostraron una señal de fluorescencia relativamente uniforme a lo largo del borde de las células (Figura 60). Por el contrario, en las cepas mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ se observó una señal irregular con manchas brillantes, lo que indica una deslocalización de la quitina.

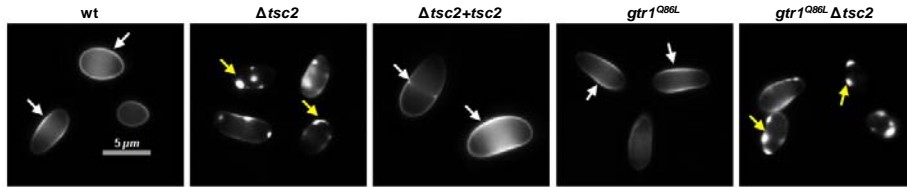


Figura 60. Morfología de los microconidios. Las estirpes fueron inoculadas en medio líquido PDB y teñidas con blanco de calcoflúor a las 2 horas de incubación. Las flechas blancas y amarillas indican la señal de fluorescencia uniforme a lo largo de la pared y las manchas fluorescentes irregulares, respectivamente. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia a 100X de aumento.

Entre las 4 y las 6 horas tras la inoculación, las germínulas de los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostraron un retraso en la germinación y una señal de fluorescencia de la pared más débil que se concentraba en zonas fluorescentes irregulares, tanto en medio rico como en medio mínimo (Figura 61). Estos fenotipos se revertieron parcial- o totalmente en presencia de rapamicina. La estirpe mutante $gtr1^{Q86L}$ exhibió un fenotipo muy similar a la estirpe silvestre, aunque la velocidad de crecimiento fue mayor a partir de las 10 horas, tanto en medio PDB y en presencia de nitrato de sodio. Entre las 12 y 14 horas tras la inoculación, todas cepas ensayadas fueron capaces de esporular en las tres condiciones ensayadas (PDB, PDB + Rapa y MM + NaNO_3) (datos no mostrados).

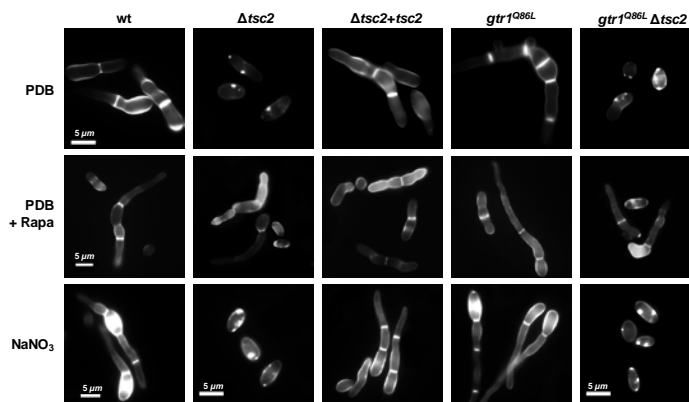


Figura 61. Morfología de las germínulas a las 6 horas. Las estirpes fueron inoculadas en PDB en ausencia o presencia de 2 ng/ml de rapamicina (Rapa), o en medio mínimo suplementado con 25 mM de NaNO_3 , y teñidas con CFW a las 2 horas de incubación. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia a 63x y 100x de aumento.

La producción de microconidios en medio YPG fue más elevada en los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ comparado con la cepa silvestre (Figura 62A). El recuento total de microconidios producidos se incrementó casi 3 veces en $\Delta tsc2$ ($40,8 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$) y más de 2 veces en $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ ($30,7 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$), con respecto al silvestre ($14,4 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$) y la cepa complementada $\Delta tsc2+ tsc2$ ($13,2 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$). El mutante $gtr1^{Q86L}$ ($14,7 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$) mostró una conidiación similar al silvestre. En medio mínimo no se observaron diferencias significativas entre las estirpes ensayadas, excepto un ligero incremento el mutante $\Delta tsc2$ (Figura 62B).

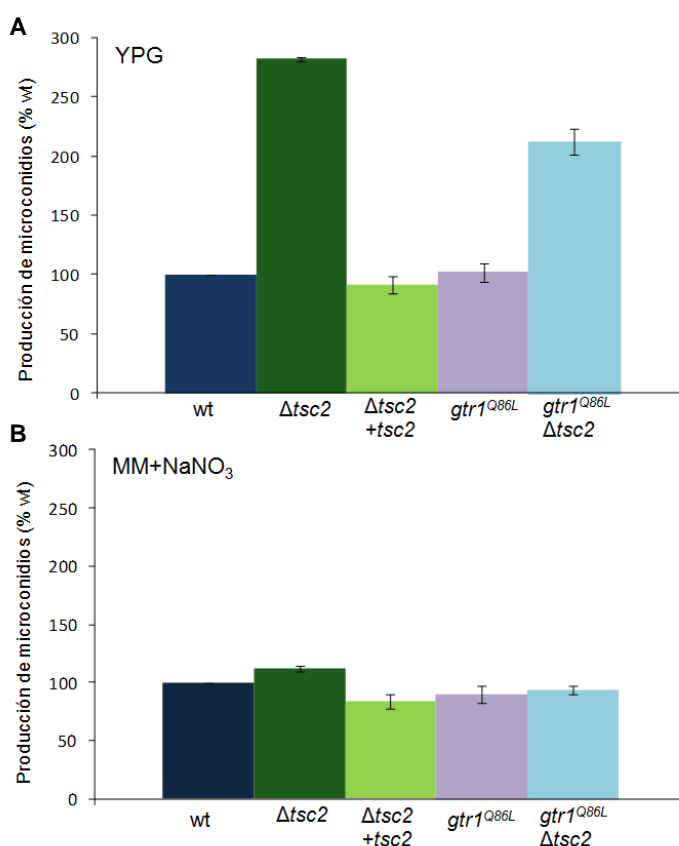


Figura 62. Producción de microconidios. Cantidad de microconidios producidos por las distintas cepas en cultivo líquido estático de medio completo YPG (A) o en medio mínimo suplementado con 25 mM NaNO₃ (B) después de 48 h de incubación a 28°C. Los valores se representan como porcentaje (%) de la cantidad de microconidios producidos por la cepa silvestre ($14,4 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$ en YPGA ó $35,8 \times 10^6$ microconidios \cdot ml $^{-1}$ en NaNO₃). Las barras representan el error estándar calculado a partir de 3 réplicas biológicas independientes.

2.2.8. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la producción de biomasa fúngica

Para determinar la producción de biomasa fúngica, se inocularon $2,5 \times 10^6$ microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ de las cepas en estudio en matraces con medio YPGA o con medio mínimo con 25 mM de NaNO_3 y se mantuvieron en agitación durante 48 horas a 28°C , tras los cual fueron centrifugados para obtener las pellas y seguidamente secados en un horno durante 24 horas para determinar el peso seco. La cantidad de biomasa de los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ fue notablemente menor en comparación con la estirpe silvestre y la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ (Figura 63). En cambio, el mutante *gtr1*^{Q86L} exhibió un aumento en la producción de biomasa. Las diferencias entre las cepas fueron mucho más pronunciadas en medio mínimo comparado con el medio completo.

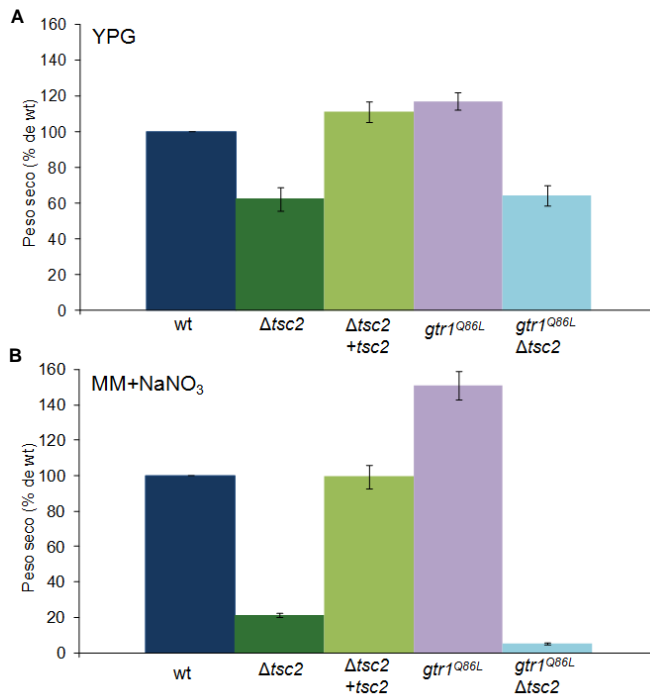


Figura 63. Producción de biomasa. Se inocularon $2,5 \times 10^6$ microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ de las cepas indicadas en 25 ml de medio líquido completo YPG (A) y en medio mínimo con 25mM NaNO_3 (B). Tras 48 horas de incubación en agitación (170rpm) a 28°C , la biomasa fúngica (peso seco) fue determinada después de la centrifugación y secado a 80°C por 24 horas. Los valores representan el porcentaje (%) del peso seco de las cepas mutantes en comparación con la cepa silvestre (wt: peso seco absoluto 0,079 gramos en NaNO_3 ó 0,559 gramos en YPG). Los errores estándar se calcularon a partir de 3 réplicas biológicas independientes.

2.2.9. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la fusión vegetativa de hifas

La frecuencia de fusión vegetativa se determinó de dos formas, mediante aglutinación macroscópica de las germínulas en placas de cultivo líquido estático (Figura 64), y por observación al microscopio contando los sucesos de fusión vegetativa en placas (Figura 65). La agregación de hifas fue examinada en medio mínimo suplementado con 25 mM de NaNO₃ en presencia o ausencia de rapamicina. La formación de agregados fue muy reducida en los mutantes $\Delta tsc2$, *gtr1*^{Q86L} y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ en comparación con la cepa silvestre y la complementada, sin embargo, la adición de rapamicina restauró la formación de agregados en las estirpes mutantes (Figura 64).

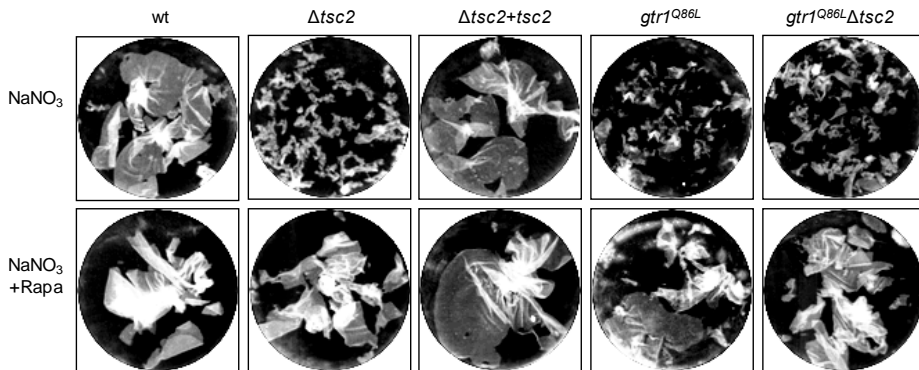


Figura 64. Frecuencia de fusión vegetativa determinada por agregados de hifas. Agregación de hifas en placas con cultivos líquido estático en medio mínimo suplementada con 25 mM de NaNO₃ en ausencia o presencia de 2 ng · ml⁻¹ de rapamicina después de 48h de incubación a 28°C. Los cultivos fueron agitados vigorosamente con una pipeta para disgregar las uniones débiles y escaneados inmediatamente. Los errores estándar fueron calculados a partir de tres réplicas biológicas independientes, cada una con 3 réplicas técnicas.

En el ensayo microscópico de fusión, todas las cepas mostraron una reducción en el porcentaje de germínulas fusionadas en presencia nitrato de amonio comparado con el nitrato de sodio (Figura 65A y B), tal como se había descrito anteriormente (López-Berges *et al.* 2010). En nitrato de sodio el mutante $\Delta tsc2$ exhibió una reducción en la frecuencia de fusión, que fue aun más acentuada en el doble mutante *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$. En nitrato de amonio, los dos mutantes mostraron una frecuencia muy baja, comparado con el

silvestre. La adición de rapamicina incrementó ligeramente la frecuencia de fusión en todas las cepas ensayadas.

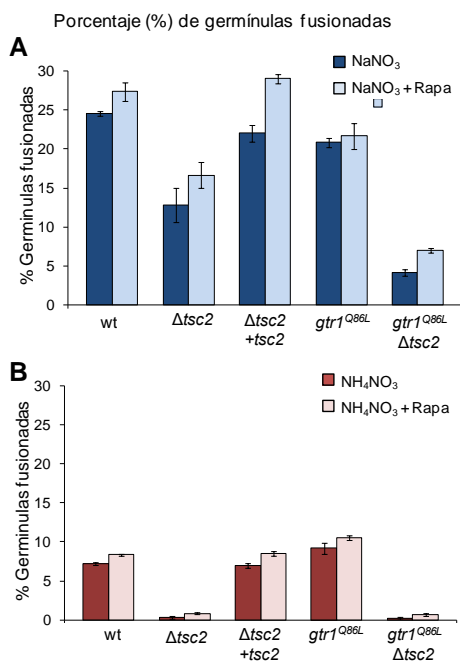


Figura 65. Frecuencia de fusión vegetativa determinada por agregados de hifas por conteo en microscopio. El porcentaje de germínulas mostrando fusión vegetativa de hifas fue determinado microscópicamente en placas con 0.5 % de agar agua suplementado con 25 mM de NaNO₃ (A) o 25 mM de NH₄NO₃ (B), en ausencia o presencia de 2ng · ml⁻¹ de rapamicina (Rapa). Los errores estándar fueron calculados a partir de tres réplicas biológicas independientes, cada una con 3 réplicas técnicas. Se contaron un total de 200 germínulas por cada réplica.

2.2.10. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en el crecimiento invasivo

Para determinar el crecimiento invasivo de las cepas analizamos la capacidad de penetración de una membrana de celofán y la colonización del tejido en cortes de manzana. En nitrato de sodio, los mutantes $\Delta tsc2$ y $\Delta tsc2 gtr1^{Q86L}$ fueron defectuosos en la penetración del celofán, mientras que la cepa $gtr1^{Q86L}$ fue algo menos eficiente en comparación a la estirpe silvestre (Figura 66A y C). La rapamicina restableció completamente la capacidad de atravesar la membrana de celofán en todas las cepas ensayadas (Figura 66B y D).

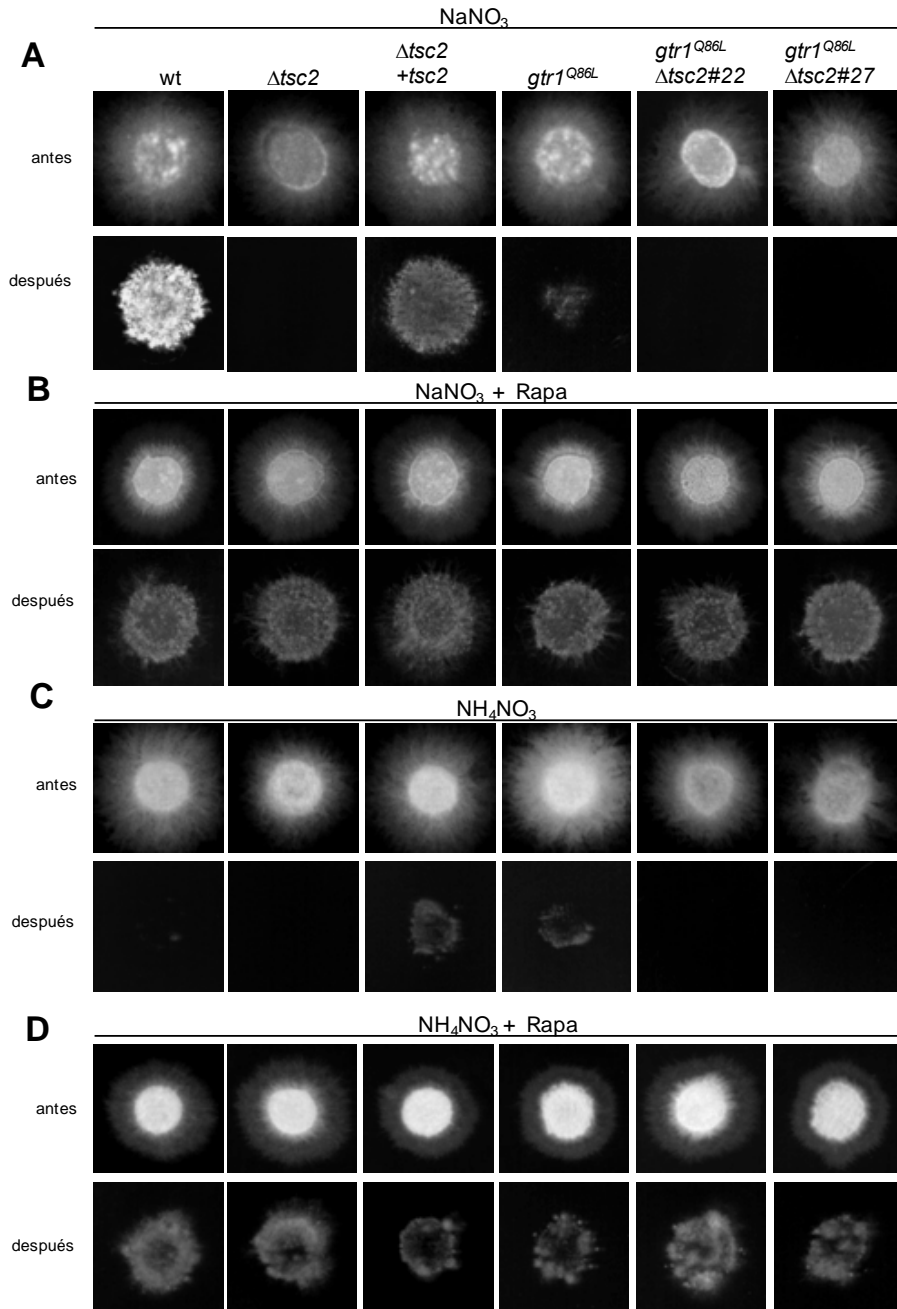


Figura 66. El defecto de los mutantes en la penetración de celofán se restaura con rapamicina. Ensayo de penetración de celofán con las cepas indicadas, en medio mínimo con 75 mM NaNO₃ (A, B) o con 75 mM NH₄NO₃ (C, D), en ausencia o presencia de 2 ng · ml⁻¹ de rapamicina.

Seguidamente se evaluó la capacidad de proliferar en el tejido vivo de la planta, inoculando 5×10^4 microconidios de las diferentes estirpes en cortes de manzana. Los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostraron una reducción significativa en la capacidad de crecimiento invasivo, mientras que el mutante $gtr1^{Q86L}$ fue ligeramente menos invasivo en los cortes de manzana, en comparación con la cepa silvestre (Figura 67).

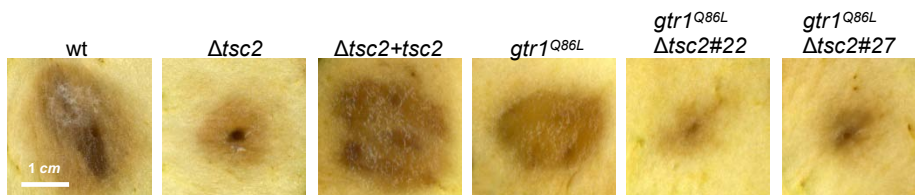


Figura 67. Colonización del tejido del corte de manzana. La invasión y maceración del tejido se evaluaron a los 4 días de la inoculación. Se muestra un experimento representativo de un total de al menos tres réplicas. La barra de escala equivale a 1 cm.

2.2.11. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la virulencia en plantas de tomate

Para evaluar el papel del gen *Tsc2* y *Gtr1* en la patogénesis de *F. oxysporum* se realizaron ensayos de infección en raíces de plántulas de tomate del cultivar Monika con 20 días de edad, que se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión de microconidios de las estirpes en estudio. Las plantas inoculadas con el mutante $gtr1^{Q86L}$ mostraron un retraso y una reducción en los síntomas de enfermedad, mientras que aquellas inoculadas con $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostraron una disminución aun mayor en la virulencia (Figura 68).

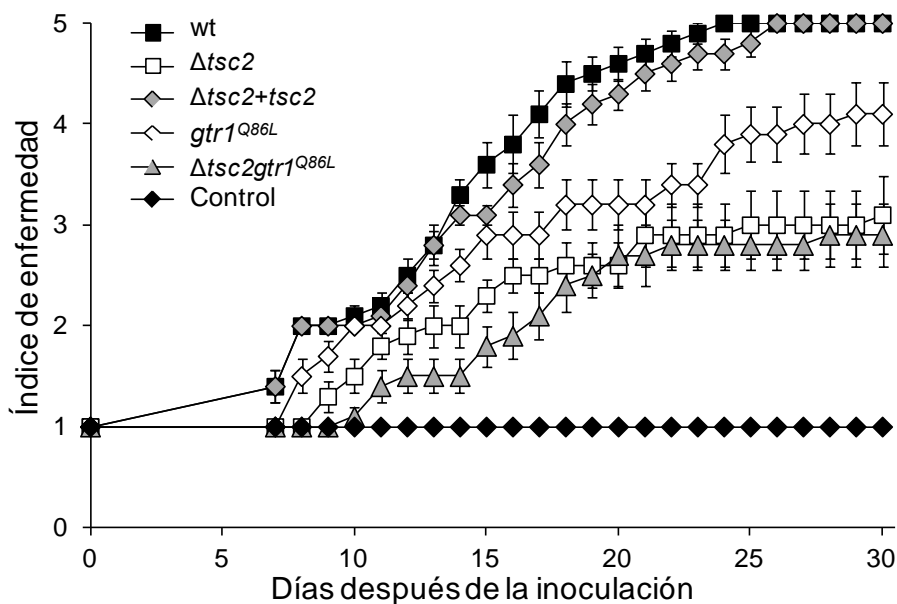


Figura 68. Síntomas de enfermedad causados por *F. oxysporum* en plantas de tomate. Grupos de 10 plantas de tomate fueron inoculadas con las cepas indicadas y los síntomas fueron evaluados como se describe en la Figura 16.

La supervivencia de las plantas infectadas con las estirpes indicadas se representó a lo largo de 30 días (Figura 69). La mayoría de las plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre murieron a los 20 días tras la inoculación. Sin embargo, el 50% de las plantas inoculadas con el mutante $gtr1^{Q86L}$ sobrevivieron, mientras que aquellas inoculadas con los mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ mostraron una supervivencia entre 80% y 90%. Según el análisis de significancia con el test de Log-rank, las diferencias en la mortalidad fueron significativas entre la estirpe silvestre y las cepas $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L}$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ (valor $P < 0,0001$; $P = 0,001$ y $P < 0,0001$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre los mutantes $gtr1^{Q86L}$ y $\Delta tsc2$ ($P = 0,1583$), pero si entre $gtr1^{Q86L}$ y el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ ($P = 0,0485$), mientras que no hubo diferencia significativa entre $\Delta tsc2$, $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ ($P = 0,1464$ y $P = 0,3173$, respectivamente), y el control con agua.

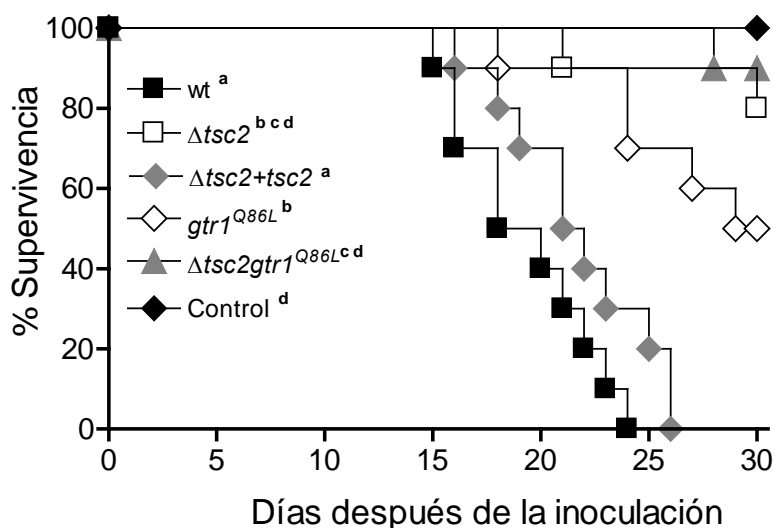


Figura 69. Mortalidad causada por *F. oxysporum* en plantas de tomate. Grupo de 10 plantas fueron inoculadas con las cepas indicadas y el porcentaje de supervivencia fue representada como se describe en la Figura 17. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

Para comparar la biomasa de las distintas cepas fúngicas en el interior de las plantas de tomate, se realizaron experimentos de cuantificación específica del ADN del hongo en raíces y tallos de plantas infectadas mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Para ello, se utilizó como molde el ADN genómico (ADNg) obtenido a partir de raíces o tallos de plantas infectadas, amplificadas con las parejas de oligonucleótidos específicos Six-1 y Six-2, que amplifican un fragmento genómico del gen *six* presente sólo en *Fusarium*, mientras que la pareja Gapdh-F y Gapdh-R amplifica un fragmento de ADN específico en el genoma de la planta de tomate. La especificidad de los cebadores fue corroborada por PCR estándar a tiempo final con ADN del hongo y de la planta (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos a partir de ADN genómico de la raíz indicaron que la cantidad de biomasa del mutante $gtr1^{Q86L}$ fue significativamente mayor a los cinco días después de la inoculación comparado con la estirpe silvestre y los demás mutantes (Figura 70A y B). Por el contrario, la cantidad de biomasa del mutante $\Delta tsc2$ y del doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ fue menor que la del silvestre a los 10 días tras la

inoculación. Los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN genómico del tallo indicaron que la cantidad de biomasa fúngica era menor en comparación a la raíz (Figura 71A). El mutante *gtr1*^{Q86L} inicialmente alcanzó a colonizar más rápido los tejidos internos del tallo que la estirpe silvestre y las demás estirpes, sin embargo, su crecimiento se fue igualando al del silvestre a los 10 días después de la inoculación. Por otro lado, la cantidad de biomasa del mutante $\Delta tsc2$ y el doble mutante *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ fue drásticamente reducida con respecto al silvestre (Figura 71B).

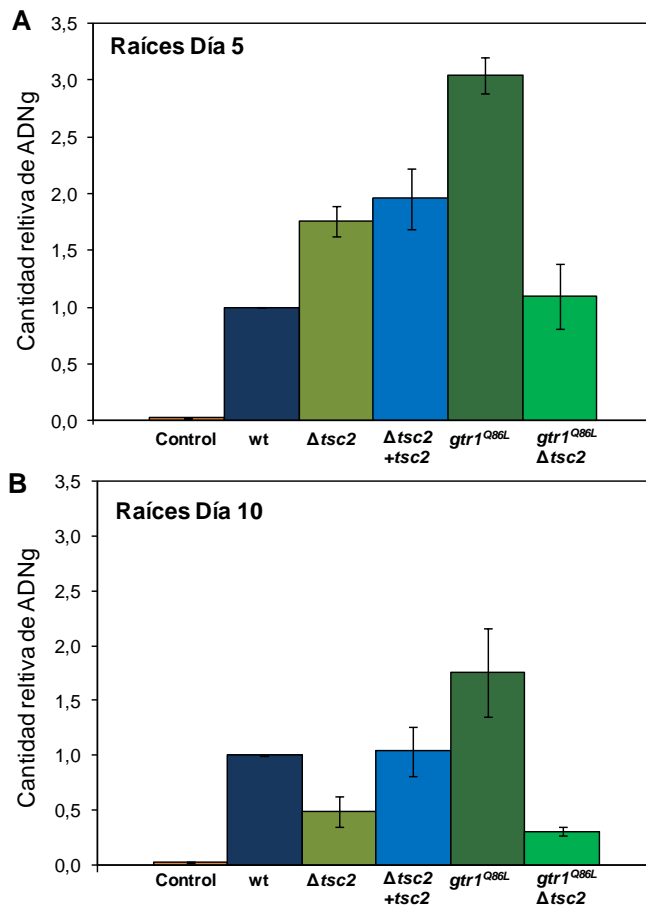


Figura 70. Cuantificación de la biomasa fúngica en el interior de las raíces de tomate. RT-PCR a tiempo real con cebadores específicos de *Fusarium* con el ADN genómico extraído de raíces de plantas de tomate a los 5 (A) y 10 días (B) después de la inoculación con las cepas indicadas. Los niveles de amplificación se indican en relación a las obtenidas a partir de plantas inoculadas con la cepa silvestre (wt). Las barras representan el error estándar tres ensayos independientes con 3 réplicas técnicas de cada muestra de ADN.

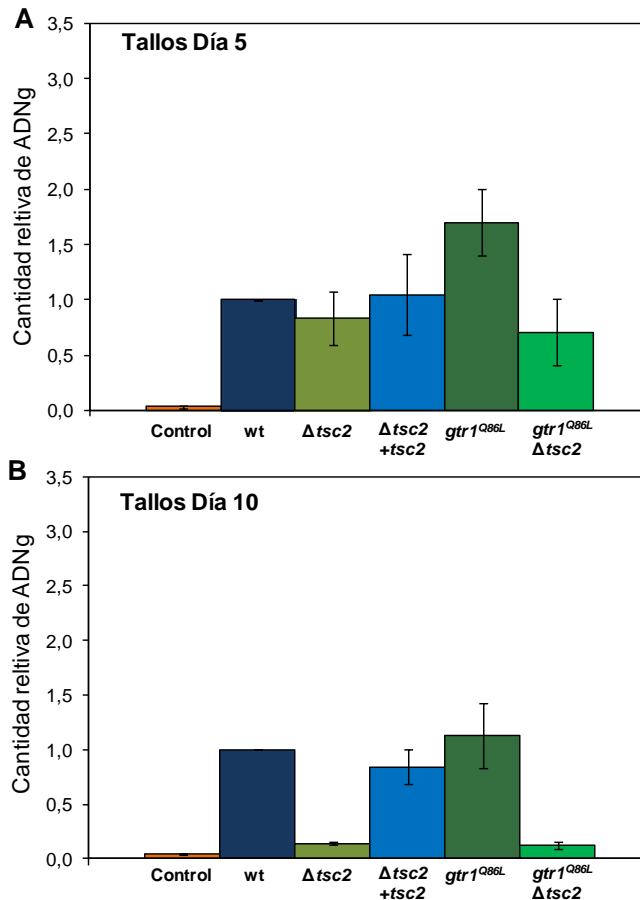


Figura 71. Cuantificación de la biomasa fúngica en el interior de los tallos de tomate. RT-PCR a tiempo real con cebadores específicos de *Fusarium*, desarrollado con el ADN genómico extraído de tallos de plantas de tomate a los 5 (A) y 10 días (B) después de la inoculación con las cepas indicadas. Los niveles de amplificación se indican en relación a las obtenidas a partir de plantas inoculadas con la cepa silvestre (wt). Las barras representan el error estándar tres ensayos independientes con 3 réplicas técnicas

2.2.12. Efectos de la mutación de *gtr1* y *tsc2* en la virulencia en *G. mellonella*

En las larvas inyectadas con $1,6 \times 10^5$ microconidios, las cepas mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ fueron significativamente menos virulentas que la estirpe silvestre (valor de $P < 0,0001$), causando una mortalidad de 30% a los tres días después de la inoculación y de 60% al cabo de ocho días (Figura 72A). El mutante $gtr1^{Q86L}$ inicialmente causó una mortalidad reducida, aunque a los 8 días tras la inoculación la supervivencia fue menos del 10%.

No se observaron diferencias significativas entre el mutante sencillo $\Delta tsc2$ y el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ ($P = 0,9524$), mientras que si hubo diferencias significativas entre $gtr1^{Q86L}$ y estos mutantes. El control con PBS fue distinto a todas las cepas ensayadas.

Por otra parte, en las larvas inyectadas con $1,6 \times 10^4$ microconidios, las cepas mutantes $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L}$ fueron significativamente menos virulentas que la estirpe silvestre, (valor de $P < 0,001$), y el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ fue aún menos virulento que el mutante sencillo $\Delta tsc2$ ($P = 0,0003$) (Figura 72B).

Se determinó la carga fúngica utilizando como molde el ADNg obtenido a partir larvas infectadas a los dos días tras la inoculación, utilizando para la normalización la pareja de cebadores Gall-For y Gall-Rev, que amplifica un fragmento del gen *Gallerimycin* (NCBI nucleotide database AF453824) presente en el genoma de *G. mellonella*. La especificidad de los cebadores fue corroborada por PCR estándar a tiempo final (datos no mostrados). La carga fúngica fue dos veces mayor en larvas inoculadas con el mutante $gtr1^{Q86L}$ con respecto a la estirpe silvestre y la cepa complementada $\Delta tsc2+tsc2$ (Figura 72C). En cambio, la carga fúngica en larvas inoculadas con el mutante $\Delta tsc2$ fue significativamente menor que en el silvestre, mientras que en las larvas inoculadas con el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ fue aun más reducida. Interesantemente, en el mutante $gtr1^{Q86L}$, a pesar de mostrar una carga fúngica superior a las otras cepas, la capacidad de infección fue reducida en comparación a la estirpe silvestre.

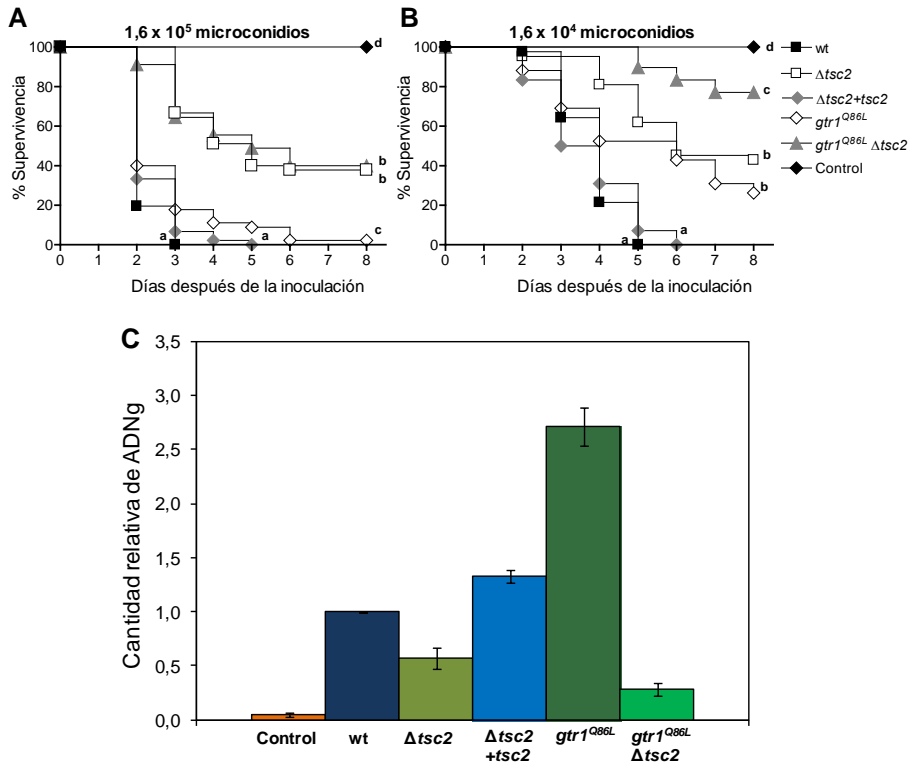


Figura 72. Mortalidad causada por *F. oxysporum* en larvas de *G. mellonella*. Grupos de 15 larvas fueron inoculados por inyección con $1,6 \times 10^5$ (A) ó $1,6 \times 10^4$ (B) microconidios de las cepas indicadas dentro del hemocele e incubadas a 30°C. El porcentaje de supervivencia fue anotada durante 8 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$). (C) Cuantificación de la biomasa fúngica en larvas de *G. mellonella*, usando RT-PCR a tiempo real con ADN genómico extraído de larvas a los 2 días después de la inoculación con las cepas indicadas. Los niveles de amplificación se indican en relación a las obtenidas a partir de plantas inoculadas con la cepa silvestre (wt). Las barras representan el error estándar tres ensayos independientes con 3 réplicas técnicas de cada muestra de ADN.

2.3. La proteína quinasa Sch9

Sch9 pertenece a la familia de proteína quinasas AGC, siendo un ortólogo a la quinasa S6K de mamíferos. Sch9 es un sustrato directo de TORC1 que regula la biosíntesis de ribosomas y el tamaño celular (Urban *et al.*, 2007). En este trabajo quisimos investigar si la delección doble de los genes *tsc2* (este estudio) y *sch9* (realizado en un trabajos previo; Aguilar-

Pontes *et al.*, sin publicar) en una misma cepa fuera capaz de revertir el fenotipo característico de la delección de *tsc2*.

2.3.1. Identificación y características de Sch9

El gen *sch9* fue identificado previamente mediante un análisis BLASTp en la base de datos genómica de *F. oxysporum* (Número de acceso: *FOXG_00582*) (Aguilar Pontes *et al.* sin publicar). Utilizando las secuencias aminoacídicas deducidas de la proteína Sch9 de *F. oxysporum*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* se generaron modelos de las estructuras tridimensionales teóricas de estas proteínas con el programa “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006). Las estructuras secundarias mostradas en la figura 73 resultaron ser muy similares entre ellas, con las mismas láminas β (en color azul y celeste), al igual que las cadenas α -hélices (en color amarillo, celeste y verde).

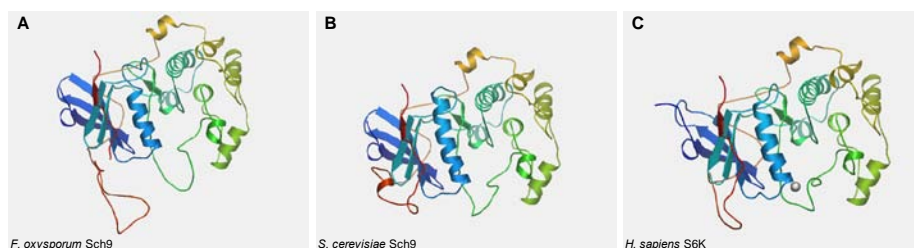


Figura 73. Modelo tridimensional teórico de las proteínas Sch9 de *F. oxysporum* (A), de *S. cerevisiae* (B) y de la proteína S6K de *H. sapiens* (C). Se representa las estructuras secundarias de las proteínas con las α hélices y las láminas β . Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex y Peitsch 1997; Schwede, Kopp *et al.* 2003; Arnold, Bordoli *et al.* 2006).

Las secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína Sch9 se compararon con las proteínas ortólogas de especies fúngicas relacionadas mediante un alineamiento *Clustal W* con el programa *BioEdit* (Hall, 1999). Dicho alineamiento mostró los porcentajes de identidad más altos con *F. verticillioides* (99.5%), *F. graminearum* (75.8%), *M. oryzae* (63.1%), *S. pombe* (62.2%), *C. albicans* (58.6%), *A. fumigatus* (56.2%), *A. oryzae* (53.8%

identidad), *A. nidulans* (51.7%), *S. cerevisiae* (55.8%), *H. sapiens* (74.0%) y *D. melanogaster* (68.8%) (Figura 74).

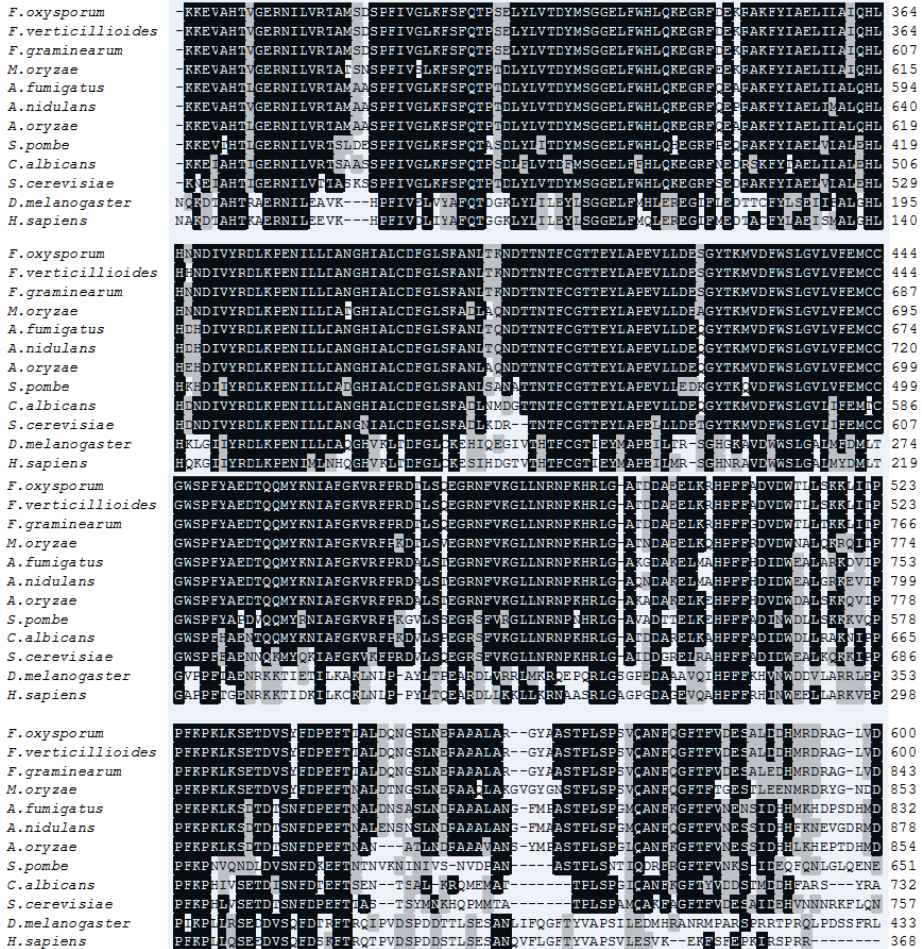


Figura 74. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Sch9 de *F. oxysporum* con los ortólogos de otros organismos. La proteína Sch9 de *F. oxysporum* se alineó con las de *F. verticilliooides*, *F. graminearum*, *M. oryzae*, *S. pombe*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* y *D. melanogaster*. Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y aquellos con características similares en gris (Alineamiento Clustal W con el programa BioEdit y Lasergene).

2.3.2. Crecimiento y desarrollo de los mutantes $\Delta sch9$ y del doble mutante $\Delta tsc2 \Delta sch9$

Partiendo de la base de los fenotipos observados en los mutantes $\Delta tsc2$ y $\Delta sch9$, se generó un doble mutante $\Delta sch9 \Delta tsc2$, transformando protoplastos de la cepa mutante $\Delta sch9$ mediante el método de *Split Marker*, utilizando la construcción con la que se reemplazó un fragmento del gen *tsc2* (Figura 51) por el casete de resistencia a fleomicina. Se obtuvieron varios mutantes dobles $\Delta tsc2 \Delta sch9$ por recombinación homóloga, identificados mediante PCR con cebadores específicos (Figura 75). Tres de ellos se analizaron en más detalle. Los dobles mutantes $\Delta tsc2 \Delta sch9$ mostraron un fenotipo de colonia muy similar al del mutante $\Delta tsc2$ (Figura 76).

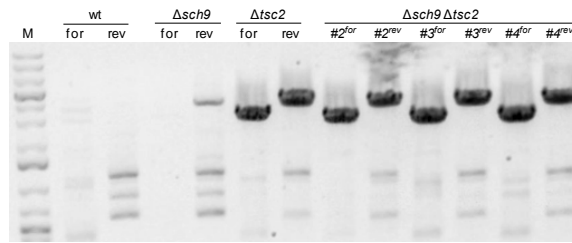


Figura 75. Análisis de los transformantes $\Delta sch9 \Delta tsc2$ mediante PCR utilizando cebadores específicos.

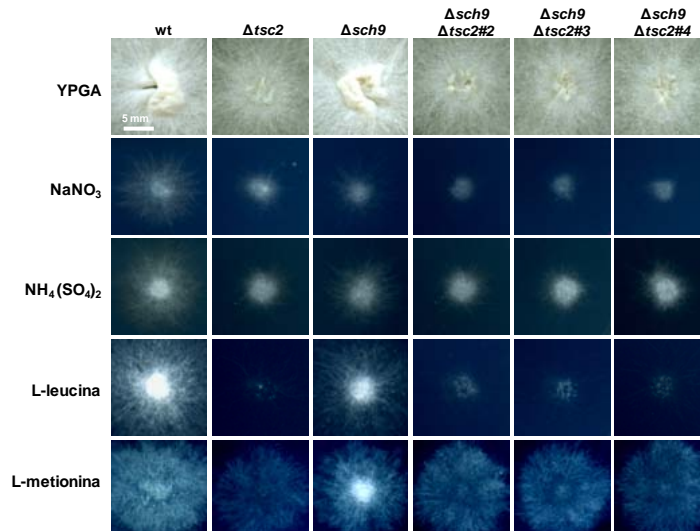


Figura 76. Fenotipo de colonia. Morfología de la colonia de la estirpe silvestre y de los dobles mutantes $\Delta tsc2 \Delta sch9$ en distintas fuentes de nitrógeno. Se inocularon 2×10^3 microconidios en placas con YPGA o en medio mínimo (MM) suplementado con 25 mM de NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-Leucina o L-Metionina. Las placas fueron incubadas durante 3, ó 5 días a 28°C y escaneadas.

2.3.3. Sensibilidad a distintos tipos de estrés

La sensibilidad del mutante $\Delta sch9$ a los distintos tipos de estrés resultó ser similar a la mostrada por la estirpe silvestre. Sin embargo, en presencia de rapamicina se observó un aumento de la sensibilidad frente a todas las condiciones ensayadas, excepto al estrés térmico. Este resultado es contrario al observado en el mutante $\Delta tsc2$ y puede indicar una mayor sensibilidad del mutante $\Delta sch9$ a rapamicina. Por otro lado, los dobles mutantes $\Delta sch9 \Delta tsc2$ fueron más sensibles que el silvestre frente al estrés térmico y al detergente SDS, similar al mutante $\Delta tsc2$. En este caso, la adición de rapamicina revirtió la sensibilidad de los dobles mutantes, restaurando el fenotipo silvestre (Figura 77).

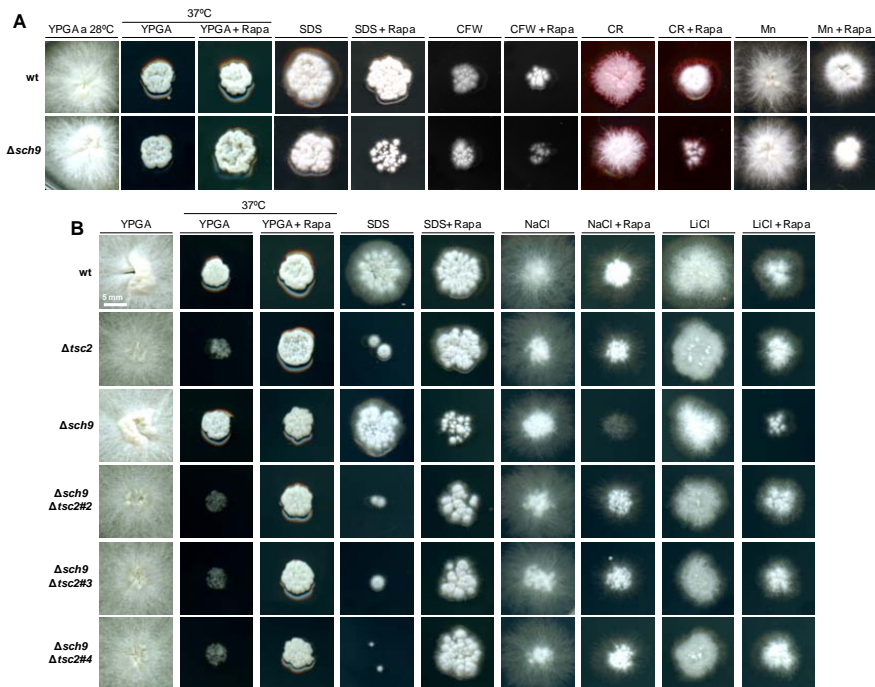


Figura 77. Sensibilidad a distintos tipos de estrés. (A) y (B) Fenotipo de la colonia de las cepas indicadas creciendo en placas de YPGA a 28°C o 37°C, o en YPGA suplementado con 0.025% de SDS, $40 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ de blanco de calcoflúor (CFW), $50 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ rojo congo (CR), 1 M de NaCl, 0.2 M de LiCl, o $10 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ Menadiona (Mn), en la ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de rapamicina (Rapa). Las placas fueron inoculadas con 5×10^4 microconidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, incubadas a 28°C excepto las YPGA a 37°C que fueron incubadas durante 24 horas a 28°C y después a 37°C, y escaneadas a los 5 ó 6 días.

2.3.4. Crecimiento invasivo y virulencia en *Galleria*

La penetración de celofán del mutante $\Delta sch9$ fue similar la estirpe silvestre. Además, en presencia de amonio la adición de rapamicina restableció completamente la penetración de la membrana (Figura 78).

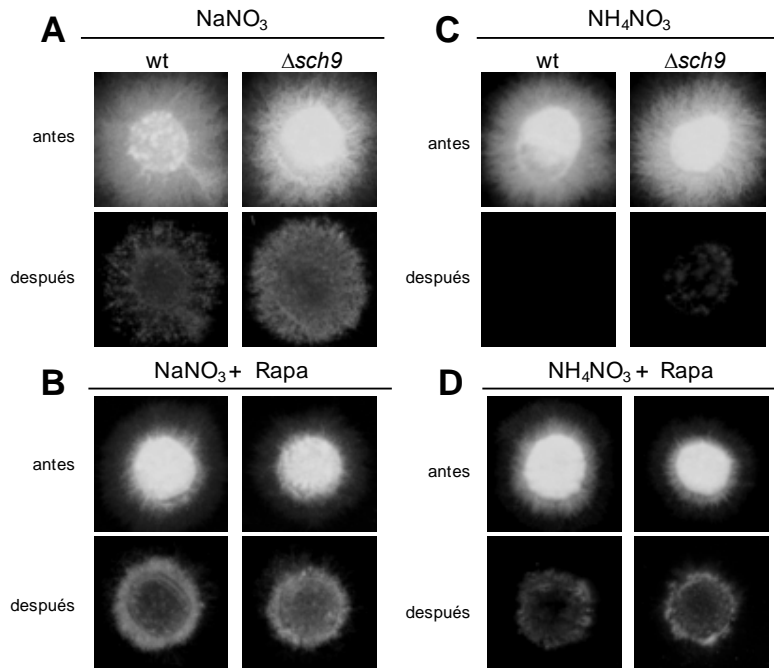


Figura 78. Penetración de membranas de celofán. Ensayo realizado con las cepas indicadas en medio mínimo con 50 mM $NaNO_3$ o NH_4NO_3 en ausencia o presencia de $2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ rapamicina.

En la infección con *G. mellonella*, la mortalidad de las larvas causada por las cepas mutantes $\Delta sch9$, $\Delta tsc2$ y $\Delta sch9 \Delta tsc2$ fue significativamente menor que la causada por la estirpe silvestre ($P = 0,0002$; $P < 0,0001$ y $P < 0,0001$, respectivamente) (Figura 79). A ocho días después de la inoculación, la supervivencia fue del 40% en el mutante $\Delta sch9$, del 20% en el mutante $\Delta tsc2$ y del 80% en los dobles mutantes. No se observaron diferencias significativas entre el mutante sencillo $\Delta sch9$ y los dobles mutantes $\Delta sch9 \Delta tsc2$, pero si hubo diferencia significativa entre el mutante sencillo $\Delta tsc2$ y estas estirpes. El control con PBS y los dobles mutantes no fueron significativamente diferentes.

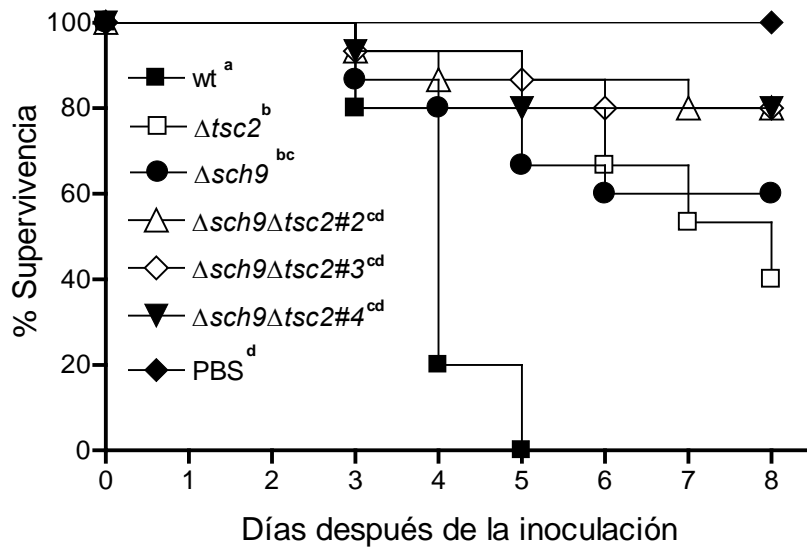


Figura 79. Ensayo de infección en larvas de *G. mellonella*. Grupos de 15 larvas fueron inoculados por inyección con $1,6 \times 10^4$ microconidios de las cepas indicadas dentro del hemocele e incubados a 30°C. Se representa el porcentaje de supervivencia a lo largo de 8 días. Los datos mostrados proceden de un experimento representativo. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellos según la prueba Log rank ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

1. Modelo de infección de *F. oxysporum* en el hospedador invertebrado *G. mellonella*

Los patógenos microbianos emplean un arsenal de factores de virulencia para infectar organismos multicelulares y causar enfermedad. Algunos de estos mecanismos de virulencia son altamente específicos para determinados sistemas patógeno-hospedador, mientras que otros están ampliamente conservados entre patógenos de una cierta clase de organismos, o incluso entre aquellos que infectan hospedadores de distintos reinos. Patógenos bacterianos como *Pseudomonas aeruginosa*, utilizados como modelos de infección multihospedadores, han dado información muy útil en la identificación de rasgos comunes y mecanismos básicos de la patogénesis, que están altamente conservados en distintas clases de hospedadores evolutivamente distantes (Rahme *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 2001).

Actualmente *F. oxysporum* FGSC 9935 es el único patógeno modelo inter reinos reportado en hongos capaz de matar tanto plantas de tomate como ratones inmunodeprimidos (Ortoneda *et al.*, 2004; Prados-Rosales *et al.*, 2006; Ruíz-Roldán *et al.*, 2008). En este trabajo se examinó el potencial de la polilla *G. mellonella* como posible hospedador modelo no vertebrado para *F. oxysporum*. El modelo *G. mellonella* fue seleccionado debido a sus diversas ventajas sobre otros sistemas de infección no vertebrados como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*. Las larvas están comercialmente disponibles, pueden ser fácilmente almacenadas a temperatura ambiente y no necesitan ser propagadas en el laboratorio. *G. mellonella* tiene una respuesta inmune relativamente compleja de la cual carece *C. elegans* (Kavanagh y Reeves, 2004). Además, *G. mellonella* podría representar una alternativa útil al modelos de ratón, más caro y éticamente controverso.

Los resultados experimentales demuestran que *F. oxysporum* es capaz de proliferar en las larvas de *G. mellonella* y matar al hospedador cuando se inyecta en el hemocele. El inóculo mínimo de *F. oxysporum*

requerido para matar a las larvas fue de 10^3 cfu/larva. Esto es similar a los tamaños de inóculo descritos en *C. neoformans* (Mylonakis *et al.*, 2005) y en *Aspergillus fumigatus* (Slater *et al.*, 2010), y considerablemente más bajo que los registrados para *C. albicans* (Brennan *et al.*, 2002). La proliferación de *F. oxysporum* en *G. mellonella* fue asociada a una fuerte reacción de melanización, producida por la actividad de la propeniloxidasa y considerada como parte de la respuesta inmune del insecto. Tras matar las larvas, *F. oxysporum* los coloniza agresivamente lo cual indica que puede utilizar los insectos como fuente de nutrientes. Varios miembros del género *Fusarium* han sido previamente reportados como patógenos de insectos (Teetor-Barsch y Roberts, 1983). Sin embargo, a diferencia de los patógenos específicos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (St. Leger *et al.*, 1996), *F. oxysporum* no es capaz de atravesar la cutícula de los insectos al carecer de las funciones génicas esenciales para la penetración de la cutícula. Por tanto, la infección de *G. mellonella* depende de la inyección de células de *Fusarium* dentro del hemocelo, similar a otros patógenos humanos como *C. neoformans* (Mylonakis *et al.*, 2005), *A. fumigatus* (Slater *et al.*, 2010) y *C. albicans* (Brennan *et al.*, 2002). La disponibilidad de la secuencia del genoma completa de *M. anisopliae* (Gao *et al.*, 2011) y *F. oxysporum* (Ma *et al.*, 2010) permitirían comparar las herramientas genéticas de un entomopatógeno específico y de un patógeno generalista como *F. oxysporum*.

Un factor limitante para la infección fúngica en mamíferos es la alta temperatura del hospedador (Robert y Casadevall, 2009). A diferencia de otros modelos no vertebrados como *C. elegans*, el sistema de *G. mellonella* puede utilizarse para estudiar el efecto de la temperatura en la virulencia, debido a que las larvas pueden mantenerse a temperaturas por encima de 37°C. Nosotros observamos que la muerte de *G. mellonella* por *F. oxysporum* fue significativamente más severa a 30°C que a 37°C. Este resultado se debe probablemente a que el crecimiento de las hifas de *F. oxysporum* es mucho más rápido a 30°C que a 37°C (Martínez-Rocha *et al.*, 2008). Por el contrario, en el patógeno humano *C. neoformans* que está bien adaptado a altas temperaturas, la muerte de *G. mellonella* fue más severa a 37°C que a 30°C

(Mylonakis *et al.*, 2005). Cabe destacar que se había sugerido que la limitada capacidad de crecer a altas temperaturas podría contribuir a la preferencia de *F. oxysporum* para causar infecciones localizadas en la piel, frente a una baja incidencia de infecciones sistémicas (Nucci y Anaissie, 2002).

Para servir de modelo de infección alternativo, un hospedador no vertebrado debe mostrar un grado significativo de correlación con el modelo de ratón. Los insectos y los mamíferos presentan similitudes en cuanto a la respuesta innata inmune, tal como las células fagocíticas implicadas en la defensa contra infecciones fúngicas (Mylonakis *et al.*, 2005). En el presente estudio se examinaron seis mutantes de *F. oxysporum* en *G. mellonella*. Cinco de estos mostraron un patrón de virulencia similar al previamente descrito en ratones inmunodeprimidos (Tabla 17). Esto incluye dos mutantes ($\Delta fmk1$ y $\Delta gas1$) que mostraron una virulencia similar a la de la estirpe silvestre, y tres ($\Delta pacC$, $\Delta fgb1$ y $\Delta fmk1\Delta fgb1$) con virulencia significativamente atenuada en *G. mellonella* y ratón. Sin embargo, no hubo correlación entre la virulencia en *G. mellonella* y en plantas de tomate (Tabla 17). Este resultado está de acuerdo con un estudio previo en la bacteria *P. aeruginosa*, donde se observó una alta correlación entre el patrón de virulencia en *G. mellonella* y en ratón, pero no entre ratón y planta o entre nematodos y plantas (Jander *et al.*, 2000). Estos resultados sustentan la hipótesis de que la infección de hongos en vertebrados y no vertebrados comparte mecanismos comunes, mientras que la patogenicidad en plantas y animales tiene distinto origen evolutivo (Ortoneda *et al.*, 2004).

En otros patógenos fúngicos como *C. albicans* (Brennan *et al.*, 2002), *C. neoformans* (Mylonakis *et al.*, 2005) o *A. fumigatus* (Slater *et al.*, 2010) también se observó una correlación alta entre la virulencia en *G. mellonella* y la infección en ratón. Aun así, es importante resaltar que uno de los seis mutantes de *F. oxysporum* estudiados, $\Delta wc-1$, no mostró virulencia reducida en *G. mellonella*, pero sí en ratones (Ruíz-Roldán *et al.*, 2008). Esta discrepancia demuestra que a pesar de los paralelismos entre sistemas hospedadores vertebrados y no vertebrados, existen también diferencias. Por ejemplo, los modelos no vertebrados carecen de un sistema adaptativo inmune que sí está presente en mamíferos (Kavanagh y Reeves, 2004).

Por tanto, algunos mecanismos clave para la infección de mamíferos puede que no se detecten en el modelo *G. mellonella*. A pesar de estas posibles limitaciones, nuestros resultados indican que *G. mellonella* puede servir como modelo de alto rendimiento, coste asumible y éticamente aceptable para el estudio de la patogenicidad de *F. oxysporum* en animales. Un pre-escrutinio de mutantes fúngicos en *G. mellonella* podría, por ejemplo, reducir significativamente el número de ratones requeridos para evaluar la virulencia, incrementando así la utilidad de *F. oxysporum* como modelo para el estudio de la patogenicidad en distintos tipos de hospedadores.

2. Componentes aguas abajo de TOR

2.1. La proteína quinasa Rim15

Estudios previos en *F. oxysporum* demostraron que la capacidad de penetrar membranas de celofán constituye una función esencial para la virulencia, y que para ello se requiere de la cascada MAPK Fmk1 (Prados-Rosales y Di Pietro 2008; Rispaill y Di Pietro 2009). La represión de la penetración del celofán por amonio fue anulada en presencia de rapamicina, un inhibidor específico de la proteína quinasa TOR, sugiriendo un papel inhibitor de la vía de TOR en las funciones de virulencia en *F. oxysporum* y quizás en otros hongos patógenos (López-Berges *et al.* 2010).

Rim15 ha sido vinculada a la ruta de señalización TOR, por lo que su caracterización en *F. oxysporum* era de interés para estudiar su implicación como componente aguas abajo de TOR. En este estudio se ha identificado el supuesto ortólogo de *rim15* en el genoma de *F. oxysporum*. Con las secuencias de aminoácidos deducidas se generó un modelo teórico tridimensional que mostró una gran similitud con la estructura secundaria de la proteína Rim15 de *S. cerevisiae* (Figura 12). Además, la proteína Rim15 de *F. oxysporum* presenta en su extremo amino terminal un dominio PAS conservado, que está implicado como sensor para una variedad de estímulos, (Cameroni *et al.* 2004).

Los mutantes nulos $\Delta rim15$ no mostraron alteraciones en el crecimiento o desarrollo de las colonias en comparación al silvestre. Sin embargo, mostraron una mayor resistencia a la rapamicina, lo que podría estar debido al fallo de los mutantes $\Delta rim15$ en la parada el crecimiento y la entrada en la fase G_0 , en limitación de nutrientes Reinders *et al.* (1998). Además, aunque la delección de *rim15* no afectó el crecimiento y el desarrollo del hongo, si causó una disminución de los síntomas de enfermedad durante la infección de plantas y de *G. mellonella*. Esta reducción podría explicarse debido a que Rim15 controla distintos mecanismos asociados con la infección y la adaptación al hospedador, tal como la evasión o adaptación a los mecanismos de defensa de la planta y del insecto. En *S. cerevisiae*, la pérdida de Rim15 causa un fenotipo pleiotrópico, afectando procesos celulares como la acumulación de trehalosa y glucógeno, la desrepresión transcripcional de los genes regulados por nutrientes, la termotolerancia, la resistencia al hambre, la extensión cronológica del periodo de vida y la detención de la fase G1 (Cameroni *et al.*, 2004; Preduzzi *et al.*, 2003; Roosen *et al.*, 2005; Wei *et al* 2008).

En futuros estudios será importante caracterizar en más detalle el papel de Rim15 durante el proceso de infección. Esto implicaría el análisis de expresión de genes de la planta relacionados con la respuesta de defensa, para estudiar la acumulación de transcritos en plantas inoculadas con el mutante en comparación con plantas inoculadas con la estirpe silvestre, así como la cuantificación de la cantidad de hongo en raíces y tallos.

3. Componentes aguas arriba de TOR

En un estudio previo se sugirió un papel inhibitorio de la vía de TOR en las funciones de virulencia de *F. oxysporum* (López-Berges *et al.* 2010). Con el fin de comprobar esta hipótesis, hemos estudiado el papel de la ruta TOR en los procesos relacionados a la virulencia en *F. oxysporum*, mediante la mutación dirigida de cuatro componentes clave aguas arriba de TOR: los supuestos transportadores de aminoácidos SLC1A5 y SLC7A5, la GTPasa Gtr1 y el regulador de GTPasa Tsc2. En la Tabla 18 se presenta un resumen

de los principales fenotipos observados en los distintos mutantes analizados en este trabajo.

Tabla 18. Fenotipos principales de los mutantes estudiados en el presente trabajo.

Fenotipo	Mutante							
	$\Delta rim15$	$\Delta slc1A5$	$\Delta slc7A5$	$\Delta tsc2$	$gtr1^{Q86L}$	$gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$	$\Delta sch9$	$\Delta tsc2$
Utilización de fuentes no preferentes de nitrógeno	0	-	-	-	+	-	+	-
Velocidad de crecimiento	0	0	0	- *	+	- *	n. d.	n. d.
Agregados / fusión de hifas	- *	- *	- *	- *	- *	- *	n. d.	n. d.
Resistencia a estrés térmico	n. d.	n. d.	n. d.	- *	+	- *	+	-
Resistencia a estrés de membrana y pared	n. d.	n. d.	n. d.	- *	+	- *	+	-
Resistencia a rapamicina	+	-	-	-	-	-	-	+
Crecimiento invasivo	0	0	-	- *	- *	- *	+	n. d.
Virulencia en plantas de tomate	-	-	-	-	-	-	n. d.	n. d.
Virulencia en <i>G. mellonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Colonización del tejido del hospedador	n. d.	n. d.	n. d.	-	+	-	n. d.	n. d.

(+) aumento (-) reducción (0) no hay fenotipo (*) fenotipo se revierte con rapamicina (n. d.) no determinado

En base a los resultados del análisis genético, se ha elaborado un modelo preliminar de la señalización de la ruta TOR en *F. oxysporum* (Figura 80). Según este modelo, la sobreactivación de TOR, ya sea por la inactivación del gen *tsc2* o la expresión de un alelo constitutivamente activo del gen *gtr1*, regula negativamente el crecimiento invasivo y la virulencia de *F. oxysporum*. Además, dichas mutaciones producen una serie de fenotipos que difieren según el mecanismo de la sobreactivación. En los mutantes *tsc2* se observaron alteraciones en el crecimiento y desarrollo en condiciones limitantes de nitrógeno, sensibilidad a distintos tipos de estrés y reducción de la capacidad de agregación y fusión de hifas. Sin embargo, los mutantes *gtr1*^{Q86L} mostraron un crecimiento acelerado y una proliferación celular incrementada. En ambos tipos de mutantes, la sobreactivación de la cascada TOR resultó en la reducción significativa de la capacidad de invasión del hospedador y en un retraso en el desarrollo de enfermedad, tanto en plantas como en animales (Figura 80).

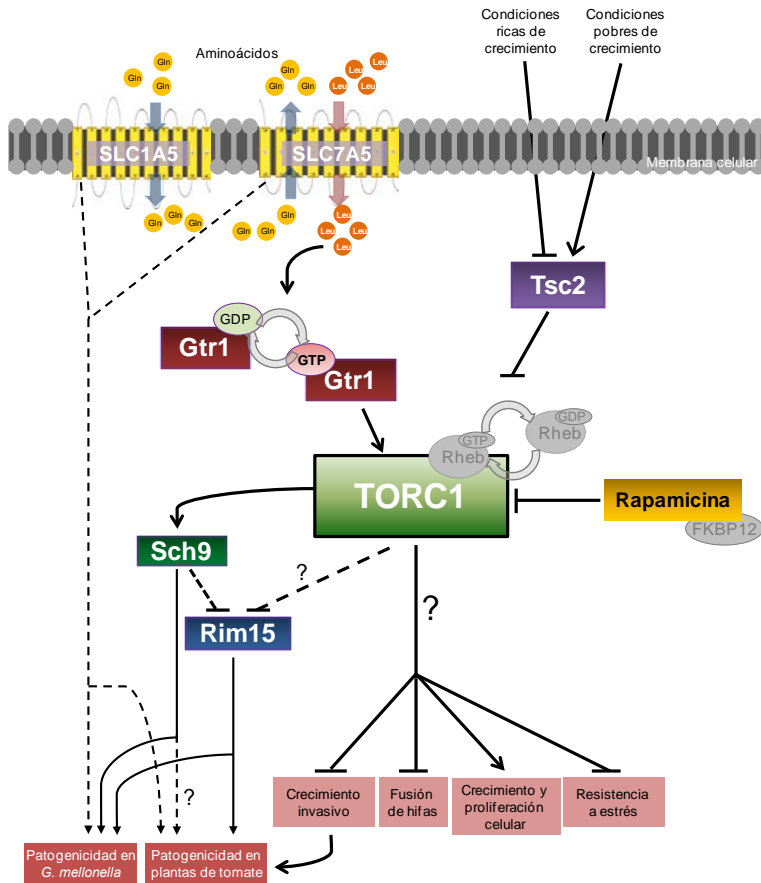


Figura 80. Modelo de la regulación de TOR en *F. oxysporum* y su papel en la virulencia.

3.1. Las proteínas SLC1A5 y SLC7A5: posible papel en la utilización de aminoácidos y en virulencia

En animales, el aminoácido esencial leucina regula positivamente la activación de mTORC1. Sin embargo, hasta hace poco se desconocía el mecanismo a través del cual la leucina entra en la célula para activar mTORC1, así como el papel de la glutamina en este proceso (Laplante y Sabatini 2009; Cohen y Hall, 2009). Recientemente se determinó que la activación de mTORC1 en respuesta a leucina requiere la carga previa de las células con glutamina. Aunque la glutamina por sí misma no tiene ningún efecto sobre mTORC1, es necesaria su presencia en la célula para que la leucina pueda ejercer su efecto activador (Nicklin *et al.* 2009). Mediante el

uso de inhibidores farmacológicos y de ARNs de interferencia, se demostró que la absorción de glutamina requiere SLC1A5, un transportador de alta afinidad para aminoácidos neutros que carecen de cadenas laterales ramificadas (Fusch y Bode 2005; Gliddon *et al.*, 2009). Por otro lado, la entrada de leucina y posterior activación de mTORC1 se produce a través de un transportador heterodimérico llamado SLC7A5-SLC3A5, que funciona como antiportador: importa aminoácidos ramificados tal como la leucina, a la vez que exporta glutamina. Ambos transportadores funcionan como activadores de mTORC1. Según el modelo propuesto, en primer lugar SLC1A5 produciría un incremento en la concentración intracelular de glutamina, y en segundo lugar SLC7A5/SLC3A5 utilizaría la glutamina como sustrato de salida para la absorción de leucina que posteriormente conduce a la activación de mTORC1 vía la GTPasa Rag (Nicklin *et al.*, 2009).

Las proteínas Slc1A5 y Slc7A5 no se habían estudiado previamente en ningún hongo patógeno, por lo que su caracterización en *F. oxysporum* era de gran interés. El crecimiento y desarrollo de los mutantes $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc7A5$ en distintas fuentes de nutrientes es similar al de la estirpe silvestre, excepto en presencia de leucina, donde se observa una disminución del crecimiento de la colonia y en la ramificación de las hifas. Estos resultados sugieren que las mutaciones en los genes *slc1A5* y *slc7A5* causan una alteración en la capacidad de *F. oxysporum* para transportar leucina. Cabe destacar que en *D. melanogaster*, la inhibición del transporte de glutamina o leucina mediante silenciamiento de *SLC1A5* o *SLC7A5-SLC3A5*, respectivamente, también causó una reducción notable en el tamaño celular.

Por otra parte se observó que la adición de rapamicina causa una reducción del tamaño de las colonias en la estirpe silvestre, y que dicho efecto fue más acentuado en los mutantes $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc7A5$, indicando una mayor sensibilidad de estos mutantes a la rapamicina que podría estar causado por una inhibición aguas arriba en la ruta TOR.

Por homología con sistemas animales, Slc7A5 utilizaría la glutamina como sustrato de salida para la absorción de leucina. En los ensayos relacionados con la virulencia, los mutantes $\Delta slc7A5$ fueron ligeramente

menos eficientes en la penetración del celofán con respecto al silvestre y a los mutantes $\Delta slc1A5$. Estos resultados coinciden con lo observado en el crecimiento en tejido de manzana, en el cual la mutación del gen $slc7A5$ causó un fenotipo menos invasivo. Por tanto, $Slc7A5$ parece contribuir al crecimiento invasivo de *F. oxysporum*. Por otro lado, tanto los mutantes $\Delta slc1A5$ como $\Delta slc7A5$ mostraron un patrón de virulencia reducido en la infección de plantas de tomate y en larvas de *G. mellonella*. Ello indica que estos transportadores podrían regular algún proceso general de patogénesis tanto en plantas como en animales (Figura 80).

Quedaría pendiente caracterizar más profundamente el papel de estos transportadores. Serían necesarios estudios bioquímicos y fisiológicos para determinar la capacidad de cada proteína de transportar diversos tipos de aminoácidos. Además, el silenciamiento de $SLC1A5$ o la ausencia de glutamina induce el proceso de autofagia (Nicklin *et al.*, 2009). Quedaría por determinar, si los mutantes $\Delta slc1A5$ y $\Delta slc7A5$ muestran también un aumento en la inducción de autofagia, proceso que se ha descrito recientemente en el patógeno relacionado *F. graminearum* (Khan *et al.* 2012). Además se podrían estudiar las posibles alteraciones en la morfología vacuolar mediante el análisis microscópico (utilizando colorantes específico que tiñen la vacuola), ya que en levadura el proceso de autofagia se produce en la vacuola.

3.2. Las proteínas Gtr1 y Tsc2 regulan el desarrollo, la respuesta a estrés y la virulencia a través de TOR

En animales, la disponibilidad de aminoácidos y de factores de crecimiento es señalizada a través de las proteínas Rag y Tsc2, respectivamente, que promueven en paralelo la activación de TORC1 (Kim *et al.*, 2008). RagA/B y RagC/D (Gtr1 y Gtr2 en levadura), son GTPasas de la familia de las proteínas Ras que funcionan como heterodímeros y cambian su estado de activación en función de los niveles de aminoácidos. Similar a las GTPasas Rag en mamíferos, en levaduras el complejo Gtr1-GTP y Gtr2-GDP constituye la forma activa que interactúa con el complejo TOR de una manera dependiente de los aminoácidos (Binda *et al.* 2009). La

proteína mutante *Rag*^{Q66L} permanece siempre unida a GTP, por lo que interactúa fuertemente con mTORC1 (Jung y Kim 2010).

Por otro parte, la identificación del complejo Tsc1/2 como regulador negativo de mTORC1 fue un descubrimiento importante para entender el control de la ruta de activación de TOR a través de los factores de crecimiento. Estudios en *D. melonogaster* y *H. sapiens*, sugieren que las proteínas Tsc1 (hamartina) y Tsc2 (tuberina) interactúan formando un complejo que regula negativamente la actividad intrínseca de la GTPasa Rheb, el principal activador de la ruta de señalización TOR. Tsc1 es necesario para estabilizar Tsc2, mientras que el dominio C-terminal de Tsc2 funciona como activador de GTPasas (GAP). Tsc2 promueve la hidrólisis de Rheb, inactivándola (Kim y Guan, 2011). Ortólogos de las proteínas Tsc han sido identificadas en *S. pombe* (Tsao *et al.*, 2009), pero no en *S. cerevisiae* (Aspuria *et al.*, 2007).

Durante el presente trabajo, se crearon distintos mutantes de *F. oxysporum* con una versión constitutivamente activa *gtr1*^{Q86L}, una versión interrumpida $\Delta tsc2$, un doble mutante *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ y un doble mutante $\Delta tsc2$ $\Delta sch9$ (obtenido a partir de un mutante $\Delta sch9$ disponible en nuestro grupo; Aguilar-Pontes *et al.*, sin publicar). El gen *tsc2* ha resultado ser importante para el crecimiento y desarrollo, además de contribuir a la virulencia en plantas de tomate y en *Galleria*. Por otro lado, el gen *gtr1*, aunque no esencial en morfogénesis, contribuye parcialmente al desarrollo de los síntomas de enfermedad, tanto en plantas como en animales.

3.2.1. Desarrollo

En *F. oxysporum* el mutante *gtr1*^{Q86L}, portador de un alelo constitutivamente activo, muestra un crecimiento acelerado tanto en medio líquido (PDB) como en medio sólido (PDA). Por el contrario, los mutantes $\Delta tsc2$ y los dobles mutantes *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ mostraron un crecimiento retrasado, reduciendo dramáticamente la formación del micelio aéreo en medio sólido. Las estirpes mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ mostraron también un retraso en la germinación y una disminución en la cantidad de biomasa

fúngica, tanto en medio rico como en medio mínimo. Cabe destacar que el doble mutante *gtr1^{Q86L} Δtsc2* mostró un fenotipo más severo que el mutante *Δtsc2* en presencia de algunos aminoácidos. Por otro lado, el mutante *gtr1^{Q86L}* reveló un incremento de la biomasa fúngica. Estos resultados sugieren que Tsc2 y Gtr1 contribuyen a la capacidad de utilizar determinadas fuentes de nitrógeno y/o aminoácidos, llevando así a un fenotipo aditivo en los dobles mutantes. El crecimiento de los mutantes no presentó diferencias con respecto a la estirpe silvestre en los cambios en el pH extracelular. La utilización del amonio del medio causó una disminución en el pH extracelular, mientras que en nitrato se observó una alcalinización. Estas observaciones indican que el defecto del crecimiento de las cepas mutantes fue mediado por la fuente de nitrógeno y no por el pH extracelular.

El fenotipo observado en el mutante *gtr1^{Q86L}* podría explicarse con resultados obtenidos en levaduras, que mostraron que las proteínas *gtr1/gtr2* controlan la localización de la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Gao y Kaiser 2006). Esta observación sugiere un posible mecanismo mediante el cual *gtr1/2* están involucradas en la activación de la ruta TOR, en respuesta a la señal de nutrientes o por el estímulo de la entrada de los aminoácidos, regulando la disponibilidad de nutrientes (Gao y Kaiser 2006; Zinzalla y Hall 2008). En este contexto, estudios en *D. melanogaster* demuestran que la expresión de *RagA^{Q66L}* constitutivamente activa, incrementa el tamaño celular en el cuerpo graso y las alas, especialmente en condiciones de hambre de nutrientes. En células de mamíferos, la sobreexpresión de *RagA* constitutivamente activa puede activar a TORC1 incluso en la ausencia de los aminoácidos (Kim *et al.* 2008). Nuestros resultados indican que la hiperactivación de la ruta TOR, ya sea por delección del gen *tsc2* o por una mutación puntal en *gtr1*, puede llevar a una disminución o a un aumento descontrolado de la biomasa de *F. oxysporum*. Esto concuerda con los estudios recientes de Bartolomé y colaboradores (2010), que muestran que el complejo TSC1-TSC2 y mTORC1 actúa como integrador de señales nutricionales y hormonales para la regulación de la masa de células beta. Un aumento de la actividad de mTORC1 contribuye al aumento de la masa de célula beta. Sin embargo, la hiperactivación de

mTORC1 puede influir negativamente sobre la viabilidad de la célula beta, al causar resistencia a la insulina e inhibir procesos citoprotectores como la autofagia. La hiperactivación de mTORC1 en célula beta *in vivo* lleva al aumento temprano de masa celular e hipoglucemia (Bartolomé *et al.* 2010).

Por otro lado, los fenotipos de crecimiento observados en los mutantes del gen *tsc2* concuerdan con estudios en *C. albicans* que indican que *TSC2* y *RHB1* están involucrados en el crecimiento filamentoso en condiciones de hambre de nitrógeno, probablemente mediante el control de la expresión de MEP2, una permeasa de amonio y un sensor para la señal de nitrógeno. Su expresión es reducida en los mutantes de *TSC2* y se restablece en presencia de rapamicina (Tsao *et al.*, 2009). Estudios realizados por Van Slegtenhorst y colaboradores (2004), encontraron que la expresión de otras tres permeasas de aminoácidos con homología a la permeasa de aminoácidos (Gap1p) en *S. cerevisiae*, es reducida en mutantes $\Delta tsc1$ y $\Delta tsc2$, sugiriendo que Tsc1 y Tsc2 juegan un papel importante en la detección de aminoácidos y que además, los niveles de expresión de las permeasas así como su localización, son cruciales en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Estudios en *C. albicans* mostraron que el defecto de la absorción de nutrientes en $\Delta tsc1$ y $\Delta tsc2$ podría deberse al funcionamiento defectuoso de las permeasas. Estas permeasas estaban distribuidas homogéneamente en la estirpe silvestre, mientras que en las células *tsc1* y $\Delta tsc2$ se localizaron anormalmente como parches y dentro de las vacuolas (Matsumoto *et al.* 2002).

Cabe destacar que las alteraciones morfológicas producidas por las mutaciones de *gtr1*^{Q86L} y *tsc2*, además del defecto en el crecimiento filamentoso de las colonias de los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$, se restablecieron en gran parte con la adición de rapamicina. De la misma forma, el retraso en la germinación de los mutantes $\Delta tsc2$ y el doble mutante *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ y el aumento de la velocidad de germinación del mutante *gtr1*^{Q86L} en medio líquido PDB, fue revertido por rapamicina. Estos resultados permiten concluir que estas alteraciones son mediadas por la actividad constitutiva de la ruta TOR. Previamente, López-Berges y colaboradores (2010), demostraron que la presencia de amonio reprime los mecanismo de

virulencia en *F. oxysporum* y que esa represión es anulada en presencia de rapamicina, que es un inhibidor específico de la proteína TOR. En animales, mTORC1 es un regulador negativo de la autofagia cuando factores de crecimiento y nutrientes están presentes. En células beta la delección de *Tsc2* *in vitro* produce un aumento de la proliferación dependiente de mTORC1 mientras que el bloqueo de mTORC1 con rapamicina produce el efecto inverso (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004).

La fusión de hifas (anastomosis) se produce durante el ciclo de vida en los hongos filamentosos, particularmente durante el inicio de la colonia, en el desarrollo de la madurez de la colonia y en el desarrollo sexual (Glass *et al.* 2004). La fusión vegetativa de hifas se produce entre conidios o germínulas durante las primeras etapas de iniciación de la colonia y posteriormente entre hifas que conducen al crecimiento de la zona periférica del micelio. Se cree que una de las funciones de la fusión vegetativa de hifas es facilitar la comunicación de señales moleculares y el transporte de agua y nutrientes dentro de la colonia, mediante la producción de una red de hifas interconectadas (Glass *et al.* 2004; Roca *et al.*, 2005).

En *F. oxysporum*, la formación de redes de hifas en placas y el análisis de la frecuencia de fusiones de germínulas mediante microscopía reveló una reducción significativa en condiciones ricas comparado con condiciones limitantes de nutrientes. El mutante *gtr1*^{Q86L} mostró una capacidad de fusión de germínulas similar al fenotipo silvestre. En cambio, el mutante Δ *tsc2* mostró una reducción en la frecuencia de fusión de germínulas, observándose un mínimo de formación de puentes de anastomosis y por consiguiente, una menor agregación celular del micelio. Este fenotipo fue aún más acentuado en el doble mutante *gtr1*^{Q86L} Δ *tsc2*. Sin embargo, la adición de rapamicina al medio restauró la formación de agregados en las cepas mutantes ensayadas. Estos resultados indican que la ruta TOR regula negativamente la formación de puentes de anastomosis y la agregación de hifas. Un estudio en *C. albicans* demostró que la ruta de señalización TOR controla positivamente la filamentación y negativamente la adhesión celular, regulando la expresión de genes específicos de la superficie celular en hifas, tal como las adhesinas y sus represores

transcripcionales Nrg1 y Tup1. Además, la rapamicina puede inhibir el crecimiento de las hifas en medio sólido y promover la agregación celular y floculación (Bastidas *et al.* 2009; Shertz y Cardenas 2011).

3.2.2 Respuestas a estrés

Muchos aspectos de la pared celular y de su regulación por señales de estrés están conservadas entre *S. cerevisiae* y especies patógenas como *C. albicans* o *A. fumigatus* (Duran y Nombela 2004; Levin 2005). En *S. cerevisiae* se ha identificado una vía de respuesta general a estrés que está mediada por la proteína quinasa A (PKA). Por otro lado, también se han identificado vías específicas de respuesta a cada una de las condiciones de estrés. Así, la vía de HOG (High Osmolarity Glicerol) regula la respuesta a estrés osmótico, el factor de transcripción HSF (Heat Shock Factor) induce genes en respuesta a estrés térmico y los factores Yap1p y Yap2p regulan la respuesta a estrés oxidativo, entre otros mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos (Kim *et al.*, 2006 y Folch-Mallol *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, el mutante $\Delta tsc2$ y el doble mutante $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$, pero no el mutante $gtr1^{Q86L}$, mostraron un incremento en la sensibilidad a condiciones de estrés térmico y a compuestos que interaccionan con la membrana citoplasmática como el SDS y con la pared como el CR y el CFW. Dichos fenotipos fueron más acusados en el doble mutante. Además, se observaron diferencias en la intensidad y distribución de la señal de fluorescencia en las germinulas de $\Delta tsc2$ y $gtr1^{Q86L} \Delta tsc2$ teñidos con CFW, en comparación con la estirpe silvestre, indicando una posible disminución de la accesibilidad o deposición de N-acetil glucosamina en la pared celular (Elorza *et al.* 1983; Roncero y Durán, 1985; Martín-Urdíroz *et al.* 2004). En conjunto, estos fenotipos indican que la mutación en *tsc2* causa alteraciones en la composición y biosíntesis de polisacáridos que integran la pared celular del hongo. Como ejemplo cabe destacar la deslocalización de la quitina, un polisacárido que constituye un componente esencial de la pared celular en hongos filamentosos, formando una fina capa cercana a la membrana plasmática (Martín-Urdíroz *et al.*

2004). Por otro lado, el mutante *gtr1^{Q86L}* muestra una mayor resistencia a distintas condiciones de estrés oxidativo y al SDS, lo cual sugiere diferencias en la composición de la pared celular entre este mutante y el silvestre.

Estudios en *S. cerevisiae* describen que la respuesta a estrés térmico con un incremento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (de las siglas en inglés por Heat Shock Proteins). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de proteínas causados por desnaturalización (Hipkiss, 2006; Folch-Mallol *et al.*, 2004). Un trabajo reciente describe que la activación constitutiva de mTOR puede incrementar la carga de moléculas chaperonas, produciendo proteínas mal plegadas. La deficiencia de la traducción de Hsp70 en células con la señalización de mTOR hiperactivada contribuye a su vulnerabilidad al estrés (Sun *et al.*, 2011). También se señala en este trabajo, que la pérdida de TSC1 o TSC2 causa estrés en el retículo endoplasmático (RE) y activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). De acuerdo con esta idea, la hiperactivación de TOR podría desencadenar la respuesta de proteínas desplegadas en *F. oxysporum*.

Por otro lado, estudios en *D. melanogaster* muestran que el aumento de la señalización de Rheb-TOR en el músculo puede aumentar la sensibilidad de los adultos al estrés oxidativo. Estos resultados implican que las situaciones patológicas que aumentan la actividad de TOR podrían perturbar la capacidad del organismo para hacer frente al estrés, causando la progresión de la enfermedad y el envejecimiento (Patel y Tamanoi, 2006).

De nuevo cabe destacar que el tratamiento con rapamicina revirtió el fenotipo de incremento de sensibilidad a estrés de los mutantes (Tabla 18). El efecto de la rapamicina fue parecido al sorbitol (un estabilizador osmótico), disminuyendo la sensibilidad al estrés por calor y a los compuestos SDS, CFW y CR. Estos resultados indican que la rapamicina es capaz de revertir los efectos de sensibilidad a distintos tipos de estrés, tras la interrupción del

gen *tsc2* lo cual nos indica que el efecto es mediado por la hiperactivación de TOR (Figura 80).

3.2.3. Crecimiento invasivo y virulencia en plantas y animales.

En este trabajo estudiamos la hipótesis de que la sobreactivación de TOR podría influir negativamente en los mecanismos relacionados con el proceso de infección en *F. oxysporum*. Una de las funciones clave es el crecimiento invasivo, determinado como la capacidad de penetración del celofán o la colonización de tejido de corte de manzana. Los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ exhibieron un defecto claro en la penetración del celofán, mientras que la cepa *gtr1*^{Q86L} fue ligeramente menos eficiente en comparación a la estirpe silvestre. Como se había descrito anteriormente (López-Berges *et al.* 2010) la adición de rapamicina restableció completamente la capacidad de atravesar la membrana de celofán en condiciones represoras (amonio). Además restableció dicha función en los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$. Los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ también mostraron una reducción en la capacidad de colonizar el tejido de la manzana, mientras que el mutante *gtr1*^{Q86L} solo fue ligeramente menos invasivo con respecto al fenotipo silvestre. En conjunto estos resultados nos revelan que Tsc2 y Gtr1 funcionan como componentes aguas arriba en la regulación de la ruta TOR, y que la sobreactivación de TOR tiene un efecto represor sobre el crecimiento invasivo en *F. oxysporum* (Figura 80).

Nuestros experimentos en *F. oxysporum* demuestran por primera vez la implicación de Tsc2 y Gtr1 en la virulencia fúngica en plantas y en *G. mellonella*. En los ensayos de infección los mutantes $\Delta tsc2$ y *gtr1*^{Q86L} mostraron un retraso significativo en la progresión de los síntomas de enfermedad. La doble mutación *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ produjo una atenuación aun mayor en la virulencia en *Galleria* comparado con el mutante sencillo $\Delta tsc2$. En consonancia con los resultados de mortalidad, la cantidad de biomasa fúngica en raíz y tallo de la planta de tomate y en las larvas de *Galleria* fue significativamente más baja en el mutante $\Delta tsc2$ y en el doble mutante *gtr1*^{Q86L} $\Delta tsc2$ comparado con el silvestre, indicando que dichas mutaciones

afectan la capacidad de *F. oxysporum* de invadir y colonizar los tejidos internos de la planta o, en el caso de las larvas de *G. mellonella*, la cavidad del hemocele. Sorprendentemente, el mutante *gtr1*^{Q86L} presentó una mayor cantidad de biomasa en comparación con la estirpe silvestre, en las raíces y tallos y en el hemocele de las larvas. Ello indica que la activación constitutiva de Gtr1 confiere, al menos inicialmente, una mayor capacidad para invadir los tejidos del hospedador (Tabla 18). Resulta llamativo que, aunque el mutante *gtr1*^{Q86L} exhibió una cantidad de biomasa superior que la estirpe silvestre, su capacidad de infección fue reducida tanto en tomate como en *G. mellonella*.

3.2.4. Papel de la proteína quinasa Sch9

Teniendo en cuenta la función conocida de Sch9 aguas abajo de TOR, en este estudio decidimos investigar la hipótesis de que la delección de *sch9* en un fondo genético $\Delta tsc2$ pudiera revertir los fenotipos asociados a la sobreactivación de TOR. Para ello se crearon mutantes dobles $\Delta tsc2 \Delta sch9$. En presencia de distintas fuentes de nutrientes (nitrógeno y aminoácidos) o en condiciones de estrés, los dobles mutantes mostraron un fenotipo muy similar al mutante $\Delta tsc2$, mientras que el del mutante $\Delta sch9$ fue similar al fenotipo silvestre. Estos resultados contrastan con la reversión de los fenotipos $\Delta tsc2$ por rapamicina, e indican que los efectos de la sobreactivación de TOR por delección de Tsc2 no se transmiten a través de Sch9, sino a través de otra ruta aguas abajo de TOR, aun por caracterizar (Figura 80).

Cabe destacar que el mutante $\Delta sch9$ mostró una mayor sensibilidad a rapamicina. Además, fue más resistente al estrés térmico que la estirpe silvestre, incluso en presencia de rapamicina. Estos resultados son coherentes con un estudio de *S. cerevisiae* donde se muestra que los mutantes longevos como $\Delta sch9$ son más sensibles a rapamicina y que su resistencia a calor y a estrés oxidativo es incrementada. Se ha sugerido que dichos mutantes incrementan la supervivencia, en parte, mediante la prevención de la toxicidad al peróxido de hidrógeno, y que la regulación por Msn2, Msn4 y Rim15 es responsable de la extensión del periodo de vida (Wei

et al. 2001). En nuestro estudio, los resultados obtenidos con los mutantes sencillos y dobles $\Delta sch9$ contrastan con aquellos obtenidos para los mutantes en componentes aguas arriba de TOR, en los cuales la rapamicina produjo una reversión de los fenotipos causados. Esto confirmaría que Sch9 funciona aguas abajo en la cascada TOR de *F. oxysporum*.

La cepa mutante $\Delta sch9$ fue capaz de invadir la membrana de celofán de forma similar a la estirpe silvestre. Por exigencias del tiempo, no hemos podido comprobar aún si los dobles mutantes $\Delta tsc2 \Delta sch9$ presentan alteraciones en la virulencia en plantas de tomate. Sin embargo, se ha determinado el efecto sobre la virulencia de *F. oxysporum* en larvas de *G. mellonella*. Tanto el mutante $\Delta sch9$ como los tres dobles mutantes $\Delta tsc2 \Delta sch9$ ensayados fueron menos virulentos que la estirpe silvestre. En contraste con los resultados obtenidos en la caracterización morfológica, donde los dobles mutantes resultaron ser muy similares al mutante sencillo $\Delta tsc2$, en la infección de *G. mellonella* los síntomas causados por los doble mutantes fueron más parecidos a la cepa $\Delta sch9$ que al mutante $\Delta tsc2$. Esto sugiere que tanto Sch9 como Tsc2 contribuyen de forma independiente a la virulencia de *F. oxysporum* en animales (Figura 80).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los componentes Tsc2 y Gtr1 de *F. oxysporum* realizan funciones independientes y paralelas para promover la activación de la ruta TOR. Las respuestas generadas afectan el desarrollo y la morfogénesis, los procesos de conidiación y germinación, la respuesta a condiciones de estrés y las funciones de virulencia. Sería conveniente, en futuros estudios, confirmar el efecto de estas mutaciones sobre la actividad de la ruta TOR a nivel bioquímico, por ejemplo midiendo la fosforilación de las conocidas dianas aguas abajo de TOR, S6K y 4EBP, mediante *western blot* con anticuerpos específicos. En experimentos preliminares realizados en este trabajo se ha utilizado un anticuerpo comercial Phospho-p70 S6 kinase (Thr389) de humanos en condiciones diferenciales de nutrientes a lo largo del tiempo. Estos experimentos preliminares no han producido resultados concluyentes, por lo que será necesario ajustar las condiciones experimentales para mejorar el rendimiento del ensayo para los trabajos futuros en *F. oxysporum*.

CONCLUSIONES

Capítulo 1

1. *F. oxysporum* es capaz de proliferar en larvas de *G. mellonella* y matar al hospedador.
2. Mutantes de *F. oxysporum* muestran una buena correlación en la virulencia en el modelo de *Galleria* y en el de ratón.
3. El ensayo de infección en larvas de *G. mellonella* representa un nuevo sistema útil, rápido, de coste asumible y éticamente aceptable para el estudio de los mecanismos de virulencia de *F. oxysporum* en animales.

Capítulo 2

1. La anulación dirigida del gen *rim15* de *F. oxysporum* no produce alteraciones en el crecimiento y desarrollo, pero provoca una reducción de la virulencia en plantas de tomate y en larvas de *G. mellonella*.
2. Los mutantes $\Delta slc1a5$ y $\Delta slc7a5$ están afectados en la capacidad de utilizar determinados aminoácidos tal como la leucina.
3. Las mutaciones en los genes *slc1a5* o *slc7a5* causan una disminución de los síntomas de enfermedad durante la infección en plantas de tomate y en larvas de *G. mellonella*.
4. La inactivación de *tsc2* o la expresión de un alelo constitutivamente activo de gen *gtr1* causa una sobreactivación de la cascada TOR con diferentes efectos fenotípicos.
5. Tsc2 es importante para el crecimiento y desarrollo en fuentes pobres de nitrógeno y contribuye significativamente al crecimiento invasivo y a la virulencia en plantas de tomate y *G. mellonella*.
6. La activación constitutiva de *gtr1* causa un aumento del crecimiento y la proliferación celular, y produce una reducción en la virulencia del hongo en plantas y en animales.
7. Tsc2 y Gtr1 realizan funciones independientes aguas arriba de TOR.
8. La sobreactivación de TOR produce un efecto represor sobre el crecimiento invasivo en el hospedador, reduciendo la virulencia tanto en plantas como en animales.
9. Los efectos de la sobreactivación de TOR por delección de *Tsc2* no se transmiten a través de la quinasa diana Sch9, sino mediante otra ruta aun desconocida aguas debajo de TOR que controla la invasividad y la virulencia de *F. oxysporum*.

BIBLIOGRAFÍA

Amezcuca C. A., Harper S. M., Rutter J. y Gardner K. H. (2002). Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure* 10: 1349-1361.

Agrios G. N. (1997). *Plant Pathology*, 4 edn. Academic Press.

Armstrong GM, Armstrong JK (1981) *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*, PE Nelson, Tousson, TA, and Cook, RJ, ed (University Park, PA, USA: State University Press), pp: 391-399.

Aperis G., Burgwyn, B., Anderson, C., Calderwood, S. y Mylonakis, E. (2007). *Galleria mellonella* as a model host to study *Fransiscella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect.* 6:729-734.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201.

Aspuria P. J. y Tamanoi F. (2004). The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* 16:1105-12.

Barbet N. C., Schneider U., Helliwell S. B., Stansfield I., Tuite M. F. y Hall M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7:25-42.

Bartolomé A., Guillén, C., Benito, M. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy* 8:1757-1768.

Bartolomé A., Guillén, C., Benito, M. (2010). TSC1-TSC2 complex on the crossroad of pancreatic beta cell signaling. Role on cell proliferation, death and survival. *An R Acad Nac Farm* 76: 357-377.

Bartolomé A., Guillén, C., y Benito, M. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation *Endocrinology*, 151: 3084–3094.

Bastidas R. J., Heitman J. y Cárdenas M. E. (2009). The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *Plos Pathogens* 5:e1000294.

Beckman C. H. (1987). *The nature of wilt diseases of plants*.

Benhamou N., Garand, C. y Goulet, A. (2002). Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Appl Environ Microbiol* 68:4044-4060.

- Bergin D., Brennam, M. y Kavanagh, K. (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 5:1389-1395.
- Binda M., Peli-Gulli M.P., Bonfils G., Panchaud N., Urban J., Sturgill T. W., Loewith R., y De Virgilio C. (2009). The Vam6 GEF Controls TORC1 by Activating the EGO Complex. *Mol Cell* 35:563-573.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. y Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53, 1367-1376.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. y Osbourn, A. (2002). "A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences". *Nature.* 418: 889-892.
- Brennan M., Thomas D., Whiteway, M. y Kavanagh, K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 34:153-157.
- Burgwyn B. y Mylonakis, E. (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol.* 9:346-351.
- Callow, J. A. (1987). "Models for host-pathogen interactions". En *The applied mycology of Fusarium*. Ed., Cambridge University Press: 39-69.
- Cameroni E., Hulo N, Roosen J, Winderickx J, y De Virgilio C. (2004). The novel yeast PAS kinase Rim 15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle* 3:462-8.
- Canero DC, Roncero MI (2008) Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98: 509-518
- Caracuel Z, Roncero MI, Espeso EA, Gonzalez-Verdejo CI, Garcia-Maceira FI, Di Pietro A (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48: 765-779.
- Carroll AM, Sweigard JA, Valent B (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Newsletter* 41: 22.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17: 540-552

Cohen A. y Hall M. N. (2009). An amino acid shuffle activates mTORC1. *Cell* 136:399-400.

Christie G. R., Hajduch E., Hundal H. S., Proud C. G. y Taylor P. M. (2002). Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem* 277:9952-9957.

de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykass, P. J., y Beijersbergen, A. G. (1998). "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi". *Nat Biotechnol* 16: 839-842.

Delgado-Jarana, J., Martinez-Rocha, A.L., Roldan-Rodriguez, R., Roncero, M.I., and Di Pietro, A.(2005). *Fusarium oxysporum* G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genet Biol* 42, 61-72.

Di Pietro A, Roncero M, Roldán M (2009) From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection. In *Plant Relationships*, Deising H (ed), Vol. 5, 10, pp 181-200. Springer Berlin Heidelberg

Di Pietro A., Madrid, M., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. y Roncero, M. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*, 4:315-325.

Di Pietro A., García-Maceira, F. I., Meglecz, E. y Roncero, M. (2001). A MAP kinase of the wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, 39:1140-1152.

Di Pietro, A., and Roncero, M.I. (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 91-98.

Divon, H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., and Fluhr, R. (2006). The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Mol Plant Pathol* 7, 485-497.

Durán R. V. y Hall M. N. (2012). Regulation of TOR by small GTPases. *EMBO reports* 13:121-128.

Dutton, M. F. (1996). Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther* 70, 137-161.

Elorza A., Soro-Arnáiz I., Meléndez-Rodríguez F., Rodríguez-Vaello V., Marsboom G., de Cárcer G., Acosta-Iborra B., Albacete-Albacete L., Ordóñez A., Serrano-Oviedo L., Giménez-Bachs J. M., Vara-Vega A., Salinas A., Sánchez-Prieto R., Martín del Río R., Sánchez-Madrid F., Malumbres M., Landázuri M. O. y Aragonés J. (2012). HIF2a Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Mol Cell* 48:681-691.

Esslinger C. S., Cybulski K. A., y Rhoderick J. F. (2005). N-gamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site. *Bioorg. Med. Chem.* 13:1111–1118.

Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S. D., Gendron C. M. y Longo V. D. (2001). Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* 292:288-290.

Farman, M.L., Eto, Y., Nakao, T., Tosa, Y., Nakayashiki, H., Mayama, S., and Leong, S.A. (2002). Analysis of the structure of the AVR1-CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 15, 6-16.

Fedhila S., Daou, N., Lereclus, D. y Nielsen-LeRoux C. (2006). Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Mol. Microbiol.* 62:339–355.

Fitzgibbon G. J., Morozov I. Y., Jones M. G. y Caddick M. X. (2005). Genetic Analysis of the TOR Pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 4: 1595–1598.

Flor HH (1947) Inheritance of reaction to rust in flax. *Journal of Agricultural Research* 74: 241-262

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296

Fuchs B. C. y Bode B. P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime?. *Semin Cancer Biol* 15:254–266.

Gao M. y Kaiser C. A. (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat Cell Biol* 8:657-667.

Garami A., Swartkuis F. J. T., Nobukuni T., Joaquin M, Roccio M., Stocker H., Kozma S. C., Hafen E., Bos J. L. y Thomas G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 11:1457-1466.

- Glass N. L., Ramussen C., Roca M. G. y Read N. D. (2004). Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol.* 12:135–141.
- Gliddon C. M., Shao Z., LeMaistre J. L. y Anderson C. M. (2009). Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *Journal of Neurochemistry* 108:372-383.
- Gordon, T. R. y Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* 35:111-128.
- Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A. y Werner-Washburne M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:187-206.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704
- Heitman J., Movva N. R. y Hall M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.
- Hall M. N. (2008). mTOR-What does it do?. *Transplantation Proc.* 40:S5-S8.
- Hall M. N. y Durán R. V. (2012). Regulation of TOR by small GTPases. *EMBO reports* 13:121-128.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hendrickson, E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. y Ausube, I F. M. (2001). Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J. Bacteriol.* 183:7126–7134.
- Hohmann, S. y W. Mager. (1997). Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. *Yeast stress responses.* S. Hohmann and W. Mager. U.S.A., Chapman & Hall:101-146.
- Hipkiss A. R. (2006). Accumulation of altered proteins and ageing: Causes and effects. *Exp. Gerontol.* 41:464–473.
- Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Garcia Maceira FI, Roncero MI, Di Pietro A (1999) Cloning and characterization of pl1 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* 35: 36-40

Imazaki, I., Kurahashi, M., Iida, Y., and Tsuge, T. (2007). Fow2, a Zn(II)2Cys6-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 63, 737-753.

Inoki K., Li Y., Xu T. y Guan K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *GENES & DEVELOPMENT* 17:1829–1834.

Inoue, I., Namiki, F. y Tsuge, T. (2002). "Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein." *Plant Cell* 14: 1869-1883.

Jacinto H. y Hall M. N. (2003). TOR signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:117–126.

Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T. y Takata, R. (2002). "Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*". *Curr. Genet.* 41: 407-413.

Jain, S., Akiyama, K., Takata, R., and Ohguchi, T. (2005). Signaling via the G protein alpha subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett* 243, 165-172.

Jander G., Rahme, L. G. y Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* 182:3843–3845.

Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

Jorgensen P., Rupes I., Sharom J. R., Schnepfer L., Broach J. R. y Tyers M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 18: 2491–2505.

Jung C. H., Ro S. H., Cao J., Otto N. M. y Kim D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584: 1287–1295.

Kaeberlein M., Kirkland K. T, Fields S. y Kennedy B. K. (2005). Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mech Ageing Dev* 126:491–504.

Kaffman A., Rank N. M., O'Neill E. M., Huang L. S. y O'Shea E. K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 396:482-6.

Kawabe, M., Mizutani, K., Yoshida, T., Teraoka, T., Yoneyama, K., Yamaguchi, I., and Arie, T. (2004). Cloning of the pathogenicity-related gene FPD1 in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathol* 70, 16-20.

Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney JO (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6: 29.

Kelley L. A. y Sternberg M. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4:363 - 371

Khan I. A., Lu J.-P., Liu X.-H., Rehman A., Lin F.-C. (2012). Multifunction of autophagy-related genes in filamentous fungi. *Microbiological Research* 167: 339– 345.

Kim J. y Guan K. L. (2011). Amino acid signalling in TOR activation. *Annu. Rev. Biochem* 80:1001-1032.

Kim E., Goraksha-Hicks P, Li L., Neufeld T. P. y Guan K.L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10:935-945.

Kim I. S., Moon H. Y., Yun H. S. y Jin I. (2006). Heat Shock Causes Oxidative Stress and Induces a Variety of Cell Rescue Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *The Journal of Microbiology* 44:492-501.

Krams S. M., y Martinez O. M. (2008). Epstein Barr Virus, Rapamycin, and Host Immune Responses. *Curr Opin Organ Transplant* 13:563–568.

Laplante M. y Sabatini D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122:3589-3594.

Li L., Miles S., Melville Z, Prasad A., Bradley G. y Breeden L. L. (2013). Key events during the transition from rapid growth to quiescence in budding yeast require post-transcriptional regulators. *Mol. Biol. Cell* 24:1-30.

Li L. y Guan K-L. (2009). Amino acid signaling to TOR activation: Vam6 functioning as a Gtr1 GEF. *Mol Cell* 35:543-545.

Li Destri Nicosia MG, Brocard-Masson C, Demais S, Hua Van A, Daboussi M-J, Scazzocchio C (2001) Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 39: 1330-1344

Loewith R. y Hall M. N. (2011). Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics* 189:1177–1201.

López-Berges M. S., Hera C., Sulyok M., Schäfer K., Capilla J., Guarro J. y Di Pietro A. (2013). The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol* 87:49-65.

López-Berges M. S., Rispai N., Prados-Rosales R. C. y Di Pietro A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* 22: 2459–2475.

Lopez-Berges MS, Capilla J, Turra D, Schafferer L, Matthijs S, Jochl C, Cornelis P, Guarro J, Haas H, Di Pietro A (2012) HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 24: 3805-3822.

López-Berges MS, A DIP, Daboussi MJ, Wahab HA, Vasnier C, Roncero MI, Dufresne M, Hera C (2009) Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Mol Plant Pathol* 10: 95-107.

Lindquist, S. 1992. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:748-755.

Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A. et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367-373.

Madrid M. P., Di Pietro A. y Roncero M. (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* 47:257–266.

Martin-Urdiroz, M., Roncero, M.I., Gonzalez-Reyes, J.A., and Ruiz-Roldan, C. (2008). ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* 7, 112-121.

Martín-Urdíroz M., Madrid M. P. y Roncero M. (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150:3175–3187.

Martinez-Rocha A.L., Di Pietro A, Ruiz-Roldan C, Roncero M.I.G. (2008) Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. *Molecular Plant Pathology* 9: 293-304.

Mattern IE, Punt PJ, van den Hondel DA (1988) A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 25

Meier C., Ristic Z., Klauser S. y Verrey F. (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *The EMBO Journal* 21:580-589.

Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodríguez Jurado, D., y Jiménez Díaz, R.M. (2003) Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 91-105.

Mes, J. J., Weststeijn, E. A., Herlaar, F., Lambalk, J. J., Wijbrandi, J., Haring, M. A. y Cornelissen, B. J. C. (1999). Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* 89.

Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B.J., and Rep, M. (2009). Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol* 10, R4.

Miller, J. D. (2002). Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv Exp Med Biol* 504, 19-27.

Miyata S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. y Drenkard, E. (2003). Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71:2404–2413.

Morton D. B., Dunphy, G. B. y Chadwick, J. S. (1987). Reactions of hemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. *Dev. Comp. Immunol.* 11:47–55.

Mylonakis E., Moreno, R., El Khoury, J., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S., Ausubel, F. y Diener, A. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun,* 73:3842-3850.

Mylonakis, E. (2008). *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165:1-3.

Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y. y Tsuge, T. (2001). "Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*". *Mol. Plant. Microbe. Interact* 14: 580-584.

Nicklin P., Bergman P, Zhang B, Triantafellow E., Wang H., Nyfeler B., Yang H., Hild M., Kung C., Wilson C., Myer V. E., MacKeigan J. P., Porter J. A., Wang Y. K., Cantley L. C., Finan P. M. y Murphy L. O. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* 136:521–534.

Nucci, M. y Anaissie, E. (2007). Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 20, 695-704.

O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Magnon, K.C., Cox, P.A., Revankar, S.G., Sanche, S., Geiser, D.M., Juba, J.H., van Burik, J.A., Padhye, A., Anaissie, E.J., Francesconi, A., Walsh, T.J., and Robinson, J.S. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. J Clin Microbiol 42, 5109-5120.

Oldham S., Montagne J., Radimerski T., Thomas G. y Hafen E. (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. Genes Dev. 14:2689-94.

Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M. N., Cordier, C., Pugin, A. y Alabouvette, C. (2003). Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Appl Environ Microbiol 69, 5453-5462.

Ortoneda M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M., Mayayo, E. y Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect Immun 72:1760-1766.

Oscan U., Oscan L., Yilmaz E., Düvel K., Sahin M., Manning B. D. y Hotamisligil G. S. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. Moll Cell 29:541-551.

Ospina-Giraldo, M.D., Mullins, E., and Kang, S. (2003). Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. Curr Genet 44, 49-57.

Panepinto J. C., Oliver B. G., Amlung T. W., Askew D. S. y Rhodes J. C. (2002). Expression of the *Aspergillus fumigatus* rheb homologue, rhbA, is induced by nitrogen starvation. Fungal Genet Biol 36:207-14.

Pareja-Jaime Y, Roncero MI, Ruiz-Roldan MC (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. Mol Plant Microbe Interact 21: 728-736

Patel P. H. y Tamanoi F. (2006). Increased Rheb-TOR signaling enhances sensitivity of the whole organism to oxidative stress. Journal of Cell Science 119:4285-4292.

Pedruzzi I., Dubouloz F., Cameroni E., Wanke V., Roosen J., Winderickx J., y De Virgilio C. (2003). TOR and PKA Signaling Pathways Short Article Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G0. Molecular Cell 12:1607-1613.

Perez-Nadales E, Di Pietro A (2011) The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 23: 1171-1185

Pnueli L, Edry I, Cohen M, Kassir Y. (2004). Glucose and nitrogen regulate the switch from histone deacetylation to acetylation for expression of early meiosis-specific genes in budding yeast. *Mol Cell Biol* 24:5197-208.

Prados-Rosales, R. C. (2008). Nuevos componentes y mecanismos de una cascada MAP quinasa en *Fusarium* y su papel en la patogénesis. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Prados Rosales, R.C., and Di Pietro, A. (2008). Vegetative hyphal fusion is not essential for plantinfection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* 7, 162-171.

Prados-Rosales R. C., Serena, C., Delgado-Jarana, J., Guarro, J. y Di Pietro, A. (2006). Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian host. *Microbes Infect* 8:2825-2831.

Prusky, D. y Keen, N. T. (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease* 77, 114-119.

Puhalla, J.E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* 60, 461-474.

Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124

Ramos, B., Alves-Santos, F.M., Garcia-Sanchez, M.A., Martin-Rodrigues, N., Eslava, A.P. y Diaz-Minguez, J.M. (2007). The gene coding for a new transcription factor (*fft1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet Biol* 44, 864-876.

Reeves, E. P., Messina, C. G., Doyle, S. y Kavanagh, K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158:73–79.

Reinders A., Bürckert N., Boller T., Wiemken A. y De Virgilio C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* 12:2943–2955

Rep, M., Meijer, M., Houterman, P. M., Van der Does, H.C., y Cornelissen, B. J. (2005). "Fusarium oxysporum evades 1-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene". *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 18: 15-23.

Rispail, N., and Di Pietro, A. (2009). *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 830-839.

Roca M. G., Arlt J., Jeffree C. E. y Read N. D. (2005). Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 4:911–919.

Roldán-Arjona, T., Pérez Espinosa, A. y Ruiz Rubio, M. (1999). "Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases." *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 852-861.

Roncero, M. I. G., Hera, C., Ruiz Rubio, M., García Maceira, F. I., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado Jarana, J., Calero, F., Velasco C., Martínez Rocha, A. L., Roldán Rodríguez, R., Roa, J., Martín Urdiros, M., Córdoba, D. y Di Pietro, A. (2003). "Fusarium as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens." *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 87-98.

Ruiz-Roldan, C., Puerto-Galan, L., Roa, J., Castro, A., Di Pietro, A., Roncero, M.I., and Hera, C. (2008). The *Fusarium oxysporum* sti35 gene functions in thiamine biosynthesis and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* 45, 6-16.

Sancak Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A. L., Nada S. y Sabatini D. M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141: 290–303.

Sancak Y. y Sabatini D. M. (2009). Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem. Soc. Trans* 37:289–290.

Sancak Y., Peterson T. R., Shaul Y. D., Lindquist R. A., Thoreen C. C., Bar-Peled L. y Sabatini D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320:1496–1501.

Seed K. y Dennis, J. (2008). Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* Complex. *Infect. Immun*, 76:1267-1275.

Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.

Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

Snyder, W. C. y Hansen, H. N. (1940). "The species concept in *Fusarium*." *Am. J. Bot.* 27: 64-67.

- Sun J., Conn C. S., Han Y., Yeung V. y Qian S-B. (2011). PI3K-mTORC1 Attenuates Stress Response by Inhibiting Cap-independent Hsp70 Translation. *Journal of Biological Chemistry* 286: 6791–6800.
- Swinnen E., Wanke V., Roosen J, Smets B., Dubouloz F., Pedruzzi I., Cameroni E, De Virgilio C. y Winderickx J. (2006). Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division* 1:1-8.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599
- Teichert S., Wottawa M., Schöning B. y Tudzynski B. (2006). Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR Kinase in Nitrogen Regulation and Secondary Metabolism. *Eukaryotic Cell* 5:1807–1819.
- Toda T., Cameron S., Sass P. y Wigler M. (1988). SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev* 2:517-527.
- Torres, A.M., Weeden, N.F., and Martín, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor Appl Genet* 85, 937-945.
- Tsao C.C., Chen Y.T., Lan C.Y. (2008). A small G protein Rhb1 and a GTPase-activating protein Tsc2 involved in nitrogen starvation-induced morphogenesis and cell wall integrity of *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* 46 126–136.
- Urban J., Soulard A., Huber A., Lippman S., Mukhopadhyay D., Deloche, Wanke V., Anrather D., Ammerer G., Riezman H., Broach J. R., De Virgilio C., Hall M. N., y Loewith R. (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 26:663–674.
- Valbuena N., Guan K. L., y Moreno S. (2012). The Vam6 and Gtr1–Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *J Cell Sci* 125:1920–1928.
- Vidan S., Mitchell A. P. (1997). Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p. *Mol Cell Biol* 17:2688-97.
- Wanke V, Pedruzzi I, Cameroni E, Dubouloz F, De Virgilio C. (2005). Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Embo J* 24:4271-4278.

- Watanabe D., Araki Y., Zhou Y., Maeya N., Akao T. y Shimoia H. (2012). A Loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol* 78:4008–4016.
- Wei M., Fabrizio P., Madia F., Hu J., Ge H., Li L. M. y Longo V. D. (2009). Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in Life span extension. *PLoS Genet* 5:1-15.
- Wei M., Fabrizio P., Hu J., Ge H., Cheng C., Li L. y Longo V. D. (2008). Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics* 4:139-149.
- Werner-Washburne M., Braun E., Johnston, G. C. y Singer, R.A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57:383–401.
- Wise D. R. y Thompson C. B. (2010). Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer. *Trends Biochem Sci* 35: 427–433.
- Wullschleger S., Loewith R. y Hall M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-484.
- Wollenweber H.W. y Reinking, O.A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. P. Parey, Berlin. 365
- Xiao Y. y Mitchell A.P. (2000). Shared roles of yeast glycogen synthase kinase 3 family members in nitrogen-responsive phosphorylation of meiotic regulator Ume6p. *Mol Cell Biol* 20:5447-53.
- Yang X., Yang C., Farberman A., Rideout T. C., Lange de C. F. M., France J. y M. Z. (2008). The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J Anim Sci* 86:E36-E50.
- Zhang H., Stallock J. P., Ng J. C., Reinhard C. y Neufeld T. P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 14:2712-2724.
- Zinzalla V. y Hall M. N. (2008). Signal transduction: Linking nutrients to growth. *Nature* 454:287-288.

ANEXOS



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

Galleria mellonella as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*

Gesabel Y. Navarro-Velasco^a, Rafael C. Prados-Rosales^{a,1}, Almudena Ortíz-Urquiza^b, Enrique Quesada-Moraga^b, Antonio Di Pietro^{a,*}

^aDepartamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^bDepartamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2011

Accepted 24 August 2011

Available online xxxxx

Keywords:

Mitogen-activated protein kinase

PacC

Virulence

Waxmoth

ABSTRACT

Fusarium oxysporum, the causal agent of vascular wilt disease, affects a wide range of plant species and can produce disseminated infections in humans. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate FGSC 9935 causes disease both on tomato plants and immunodepressed mice, making it an ideal model for the comparative analysis of fungal virulence on plant and animal hosts. Here we tested the ability of FGSC 9935 to cause disease in the greater wax moth *Galleria mellonella*, an invertebrate model host that is widely used for the study of microbial human pathogens. Injection of living but not of heat-killed microconidia into the hemocoel of *G. mellonella* larvae resulted in dose-dependent killing both at 30 °C and at 37 °C. Fluorescence microscopy of larvae inoculated with a *F. oxysporum* transformant expressing GFP revealed hyphal proliferation within the hemocoel, interaction with *G. mellonella* hemocytes, and colonization of the killed insects by the fungus. Fungal gene knockout mutants previously tested in the tomato and immunodepressed mouse systems displayed a good correlation in virulence between the *Galleria* and the mouse model. Thus, *Galleria* represents a useful non-vertebrate infection model for studying virulence mechanisms of *F. oxysporum* on animal hosts.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Fungi are an extremely versatile class of microorganisms comprised mostly of saprophytes thriving on dead organic material. Approximately 10,000 fungal species infect plants (Agrios, 1997), whereas about 400 have been reported as pathogens of mammals (De Hoog and Guarro, 1995), and a limited number can cause disease on both classes of hosts. This group of trans-kingdom pathogens includes *Fusarium oxysporum*, a soilborne fungus that causes vascular wilt on more than one hundred different plant species (Armstrong and Armstrong, 1981). *F. oxysporum* also produces infections in humans that can range from superficial or locally invasive to disseminated fusariosis, depending on the immune status of the individual (Nucci and Anaissie, 2007). The genus *Fusarium* now represents the second most frequent mold causing invasive fungal infections, and *F. oxysporum* strains rank second in the incidence of invasive fusariosis after those from the *Fusarium solani* species complex (Guarro and Gene, 1995; Nucci and

Anaissie, 2007), although the latter are much more frequent (Zhang et al., 2006). Human pathogenic isolates of *F. oxysporum* have polyphyletic origins and respond only poorly to available antifungal agents (Azor et al., 2009; O'Donnell et al., 2004).

Previous work has established that a single isolate of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, FGSC 9935, can cause disease on both tomato plants and immunodepressed mice (Ortoneda et al., 2004). The availability of molecular tools such as targeted gene knockout (Di Pietro et al., 2003) or random insertional mutagenesis (Lopez-Berges et al., 2009; Michielse et al., 2009), as well as the release of the complete genome sequence (Ma et al., 2010) make this strain a unique model for studying the genetic bases of trans-kingdom pathogenicity in fungi.

Mammalian infection models, in particular mice, have been of great value in elucidating the virulence mechanisms of microbial pathogens (Pradel and Ewbank, 2004). The drawback of these systems is that they are expensive, time consuming and entail important ethical and legal concerns. Alternatively, non-vertebrate models can provide valuable data without the need to use mammals for in vivo testing or screening purposes. Invertebrate models such as the greater wax moth *Galleria mellonella* are ethically expedient, relatively simple and inexpensive, and can be used to study both the infectious process in vivo as well as the host responses. Previous studies detected substantial commonality between microbial virulence factors and host responses during mammalian

* Corresponding author. Address: Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Gregor Mendel, 14071 Córdoba, Spain. Fax: +34 957212072.

E-mail address: ge2dipia@uco.es (A. Di Pietro).

¹ Present address: Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, USA.

and invertebrate infection (Brennan et al., 2002; Jander et al., 2000; Mylonakis et al., 2005; Slater et al., 2010).

Here we explored the use of *G. mellonella* as an alternative model for the study of virulence mechanisms of *F. oxysporum* on animal hosts. We found that *F. oxysporum* is able to proliferate inside the hemocoel of *G. mellonella* larvae and to kill and colonize the insects. *F. oxysporum* genes that are required for full virulence on immunodepressed mice also play a significant role in *G. mellonella* killing. Our results suggest a potential application of *G. mellonella* as a non-vertebrate model for studying infection mechanisms of *F. oxysporum* on animal hosts.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains and culture conditions

The fungal strains used in this study are listed in Table 1. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate FGSC 9935 (formerly 4287) was stored at -80°C with glycerol as a microconidial suspension (Di Pietro and Roncero, 1998). The generation and characterization of the following mutants or transformants, all derived from wild type strain FGSC 9935, was described previously: mitogen-activated protein kinase (MAPK) mutant $\Delta fmk1$ (Di Pietro et al., 2001), G protein subunit β mutant $\Delta fgb1$ and $\Delta fmk1\Delta fgb1$ double mutant (Delgado-Jarana et al., 2005); ambient pH response transcription factor mutant $\Delta pacC$ (Caracuel et al., 2003); β -1,3-glucanoyltransferase mutant $\Delta gas1$ (Caracuel et al., 2005); light response transcriptional regulator mutant $\Delta wc-1$ (Ruiz-Roldan et al., 2008), and a transformant constitutively expressing the green fluorescent protein (GFP) gene under control of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* promoter (Di Pietro et al., 2001). Microconidia were obtained by growing fungal cultures in potato dextrose broth (Difco, Detroit, MI) at 28°C and 150 rpm for 4 days followed by filtration and centrifugation (Di Pietro and Roncero, 1998). The microconidia were resuspended to the desired concentration in sterile phosphate-buffered saline (PBS 1X) and used for inoculation. To prepare heat-killed conidia, the suspension was incubated in a thermostatic bath at 60°C for 45 min. The extent of heat-killing of conidia was confirmed by plating serial dilutions on PDA plates.

2.2. *G. mellonella* killing assays

G. mellonella larvae in the final larval stage were obtained from the company Nutri-Reptil (Córdoba, Spain), maintained in glass Petri dishes with sterile artificial diet in the dark and used within 7 days from the day of shipment. Larvae between 0.2 and 0.3 g in weight were employed in all assays. Twelve randomly chosen larvae per treatment were used in each experiment. A Burkard Auto Microapplicator (0.1–10 μl ; Burkard Manufacturing Co. Limited, Hertfordshire, UK) with a 1 ml syringe (Terumo Medical Corporation, Somerset, NJ) was used to inject 8 μl of microconidial suspension into the hemocoel of each larva through the last left proleg. Before injection, the area was cleaned using an alcohol swab.

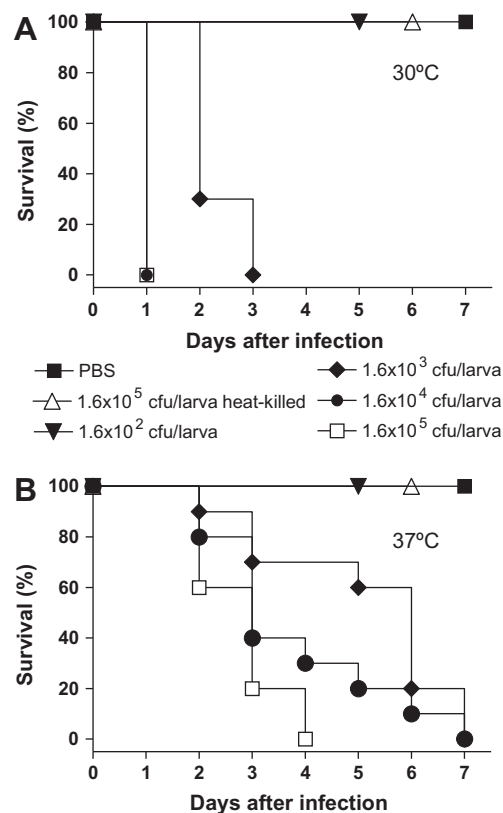


Fig. 1. Effect of inoculum concentration and incubation temperature on killing of *Galleria mellonella* larvae by *Fusarium oxysporum*. Kaplan–Meier plots of *G. mellonella* survival after injection of the indicated inocula of *F. oxysporum* isolate FGSC 9935 into the hemocoel and incubation at 30°C (A) or 37°C (B). Data shown are from one representative experiment. Experiments were performed four times with similar results.

Larvae injected with 8 μl PBS served as controls. After injection, larvae were incubated in glass containers at the desired temperature (30°C or 37°C), and the number of dead larvae was scored daily. Larvae were considered dead when they displayed no movement in response to touch.

The Kaplan–Meier test was used to assess statistical significance of differences in survival among groups. Data was plotted using Graph Pad Prism software version 3.5 for Windows. Differences indicated with a P value of less than <0.05 were considered significant. Each experiment was performed at least three times with similar results. Data presented are from one representative experiment.

For determination of fungal load, groups of 10 insects were injected with 1.6×10^3 microconidia per larva and incubated at 30°C . Forty eight hours after infection, three randomly chosen larvae per group were sacrificed, homogenized individually in 1 ml of sterile PBS, and serial dilutions were spread onto PDA

Table 1
F. oxysporum strains used in this study.

Strain	Genotype	Gene function	Reference
FGSC 9935	Wild type		Di Pietro and Roncero (1998)
$\Delta fmk1$	<i>fmk1::PHLEO</i>	MAP kinase	Di Pietro et al. (2001)
$\Delta fgb1$	<i>fgb1::HYG</i>	G protein β subunit	Delgado-Jarana et al. (2005)
$\Delta fmk1 \Delta fgb1$	<i>fmk1::PHLEO; fgb1::HYG</i>	MAP kinase/G protein β subunit	Delgado-Jarana et al. (2005)
$\Delta pacC$	<i>pacC::HYG</i>	Ambient pH response factor	Caracuel et al. (2003)
$\Delta wc1$	<i>wc-1::HYG</i>	Blue light response factor	Ruiz-Roldan et al. (2008)
$\Delta gas1$	<i>gas1::HYG</i>	β -1,3-glucanoyltransferase	Caracuel et al. (2005)
4287 GFP	<i>PgpdA-GFP; HYG</i>	Green fluorescent protein	Di Pietro et al. (2001)

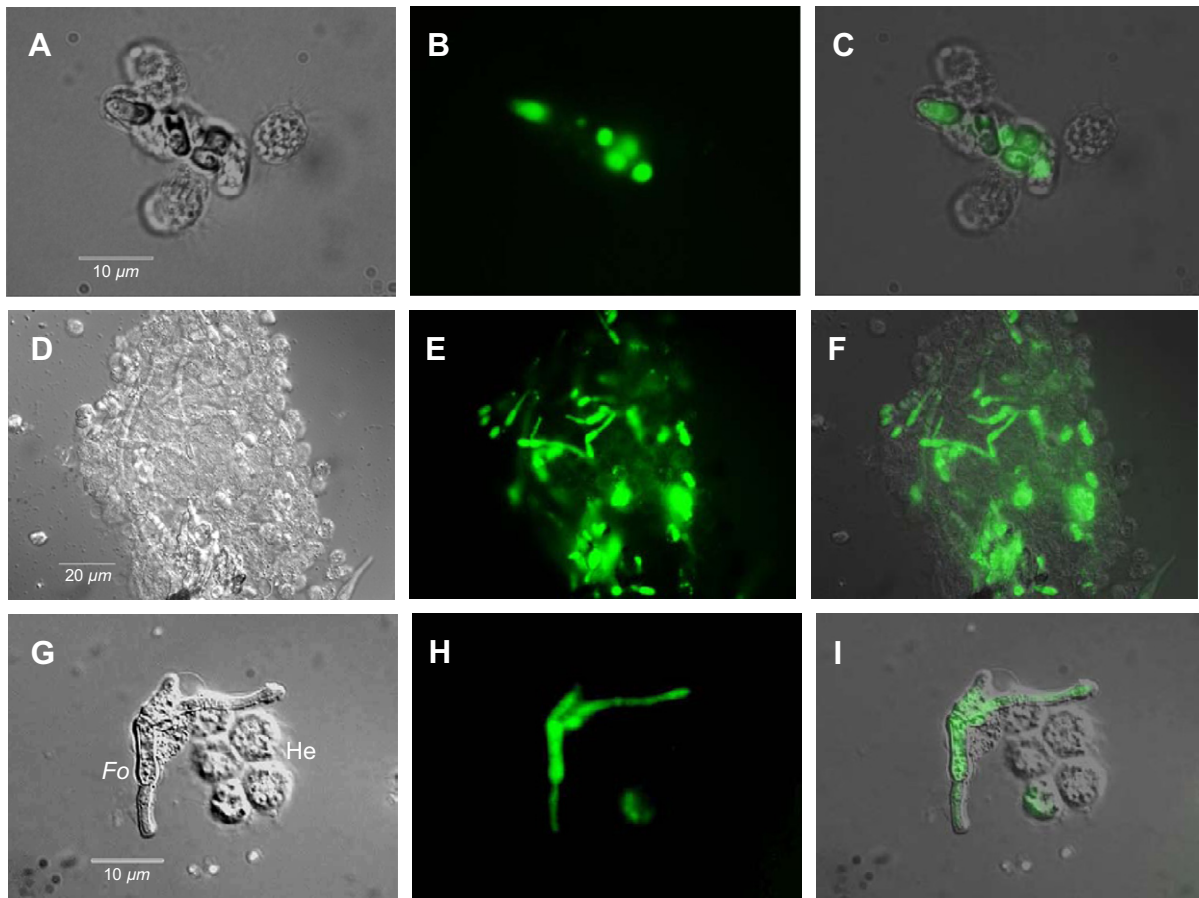


Fig. 2. Interaction between *F. oxysporum* and *G. mellonella* hemocytes. Hemolymph of *G. mellonella* larvae inoculated with 1.6×10^3 microconidia of a *F. oxysporum* transformant constitutively expressing GFP was examined under a Leica DMR epifluorescence microscope, using the Nomarski technique (A, D, G), the filter combination for GFP (B, E, H), or both images superposed (C, F, I). Phagocytosis (A–C) and nodulation (D–F) of *F. oxysporum* propagules by *G. mellonella* hemocytes is visible, as well as fungal hyphae escaping from phagocytosis by hemocytes (G–I). Fo, *F. oxysporum*. He, hemocyte.

plates containing 50 mg/ml ampicillin to prevent bacterial growth (2 plates per dilution). Colony numbers were counted after 2 days incubation at 28 °C and the number of cfu per larva was calculated. The experiment was performed four times. Statistical analysis was done using the Mann Whitney test with Graph Pad Prism software version 3.5 for Windows.

2.3. Fluorescence microscopy

For microscopic observation of fungal interaction with hemocytes, larvae were inoculated with microconidia of a *F. oxysporum* transformant constitutively expressing GFP and maintained at 30 °C or 37 °C. After 48 h the hemolymph was obtained and examined directly under a Leica DMR epifluorescence microscope, using the appropriate filter combination for GFP.

The ability of the fungus to colonize the killed larvae was determined by examining insects killed by the GFP-expressing *F. oxysporum* transformant and incubated 24 h at 28 °C/100% humidity, under a Leica MZFIll stereomicroscope.

3. Results

3.1. Injection of *F. oxysporum* conidia results in killing and colonization of *G. mellonella* larvae

Injection of microconidia of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate FGSC 9935 into the hemocoel of *G. mellonella* resulted in rapid killing

of the larvae (Fig. 1). Both rate and severity of killing increased with higher doses of fungal inoculum. While 1.6×10^2 cfu/larva failed to produce any killing, 1.6×10^3 cfu/larva caused significant killing ($P < 0.0001$). The extent of killing increased further with inocula of 1.6×10^4 and 1.6×10^5 cfu/larva, both at 30 °C ($P < 0.0001$ for both concentrations) and at 37 °C ($P = 0.1343$ and 0.0018 , respectively). The extent of killing was affected by the temperature of incubation. Killing was more severe at 30 °C than at 37 °C with all inoculum sizes tested ($P = 0.008$, 0.004 and 0.004 for 1.6×10^3 , 1.6×10^4 and 1.6×10^5 cfu/larva, respectively).

Importantly, heat-killed microconidia produced no deleterious effect on the larvae (Fig. 1). This suggests that *F. oxysporum* kills *G. mellonella* through an active infection mechanism rather than a merely physical effect of the conidia. This view is further supported by fluorescence microscopy analysis of hemolymph samples obtained from larvae injected with a *F. oxysporum* transformant constitutively expressing GFP. Fungal microconidia and germlings in the hemocoel were frequently bound to, encapsulated or phagocytosed by hemocytes (Fig. 2). Hemocytes have been reported to participate in the cellular and humoral response of *G. mellonella* against invading microorganisms (Tojo et al., 2000). We also observed *F. oxysporum* cells that were surrounded by multiple layers of hemocytes (Fig. 2D–F), a process known as nodulation (Tojo et al., 2000). However, in many cases the efficiency of haemocytes in inactivating fungal propagules appeared to be rather limited. Germination of phagocytosed conidia was frequently observed and the fungus was able to escape from the hemocytes by means of hyphal growth (Fig. 2G–I).

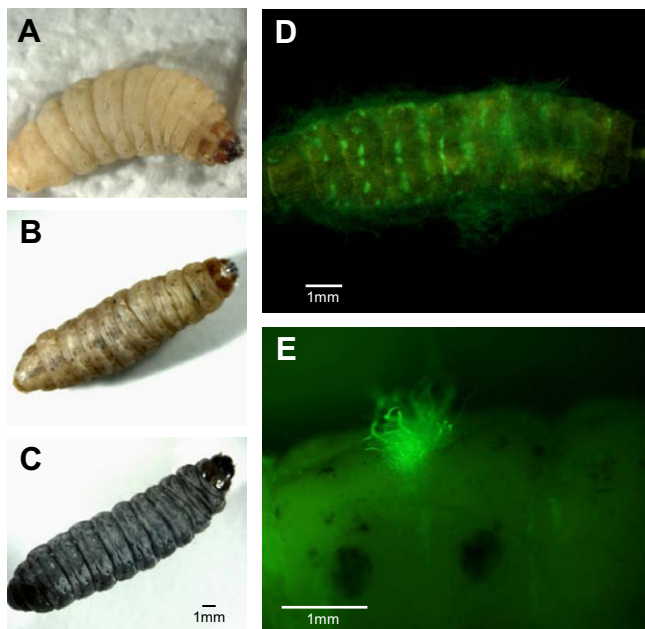


Fig. 3. Killing and colonization of *G. mellonella* by *F. oxysporum*. (A–C) Progressive melanization of *G. mellonella* larvae after inoculation with 1.6×10^3 microconidia of *F. oxysporum* and incubation at 30 °C. (D–E) Colonization of a larva killed by a *F. oxysporum* strain constitutively expressing GFP. Note the emergence of fungal mycelium through the openings of the tracheal system. Photographs were taken in a Leica MZFIII stereomicroscope.

As a result of fungal proliferation, *G. mellonella* larvae underwent progressive melanization, and most dead individuals appeared black in color (Fig. 3A–C). After killing the insects, *F. oxysporum* was able to colonize the body of the dead larvae, producing aerial hyphae that emerged from the tracheal openings (Fig. 3D and E). Collectively, these results suggest that *F. oxysporum* isolate FGSC 9935 has the capacity to counter innate defense responses, to kill and to colonize *G. mellonella* upon injection of conidia into the hemocoel.

3.2. Fungal gene knockout mutants differ in their virulence on *G. mellonella*

To further evaluate the usefulness of the *G. mellonella* infection model, we examined several knockout mutants in genes that were previously shown to be required for full virulence of *F. oxysporum* either on tomato plants or on immunodepressed mice (Table 1). Infected larvae were maintained either at 30 °C (inoculum 1.6×10^3 cfu/larva) or 37 °C (1.6×10^4 cfu/larva) (Fig. 4A and B). *F. oxysporum* mutants lacking the mitogen-activated protein kinase (MAPK) Fmk1, the β -1,3-glucanase Gas1, or the blue light response zinc finger transcription factor Wc-1, did not show significant differences in killing efficiency compared to the wild type strain (a *P* value of <0.05 was considered significant), suggesting that these components are not required for virulence of *F. oxysporum* on *G. mellonella* (Fig. 4; Table 3). By contrast, a mutant lacking the ambient pH response zinc finger transcription factor PacC showed a moderate, but significant (*P* < 0.05) reduction in killing. Moreover, a mutant lacking the heterotrimeric G protein β subunit Fgb1 was significantly less virulent than the $\Delta pacC$ mutant (*P* < 0.05), and a $\Delta fmk1 \Delta fgb1$ double mutant was even more attenuated (*P* < 0.05) than these two former strains. In agreement with the killing results, larvae infected with the $\Delta fgb1$ and the $\Delta fmk1 \Delta fgb1$ strains had significantly lower fungal burdens on

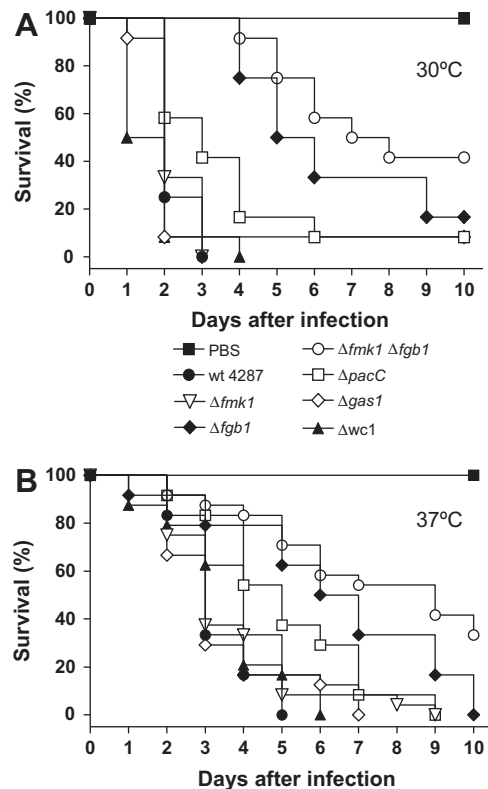


Fig. 4. Virulence of different *F. oxysporum* gene knockout mutants on *G. mellonella*. Kaplan–Meier plots of *G. mellonella* survival after injection of 1.6×10^3 (A) or 1.6×10^4 (B) microconidia of the indicated *F. oxysporum* strains into the hemocoel and incubation at 30 °C (A) or 37 °C (B), respectively. Data shown are from one representative experiment. Experiments were performed four times with similar results.

Table 2
Fungal load in *G. mellonella* larvae inoculated with different strains of *F. oxysporum*.

<i>F. oxysporum</i> strain	Mean Log ₁₀ cfu/larva ± SD ^a
FGSC 9935	4.32 ± 0.82
$\Delta fmk1$	4.45 ± 0.93
$\Delta fgb1$	3.27 ± 0.45 ^b
$\Delta fmk1 \Delta fgb1$	3.30 ± 0.41 ^b
$\Delta pacC$	4.23 ± 0.60

^a Inoculation with 1.6×10^3 microconidia/larva; incubation at 30 °C for 48 h.

^b *P* < 0.05 versus FGSC 9935.

day 2 post-inoculation (*P* < 0.05) than those inoculated with the wild type strain (Table 2).

4. Discussion

Microbial pathogens employ an arsenal of virulence factors to infect multicellular organisms and cause disease. Some of these virulence mechanisms are highly specific for a given pathogen–host system, while others are broadly conserved among pathogens of a certain class of hosts, or even among those infecting different host kingdoms. In bacterial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, trans-kingdom infection models have proven highly useful in identifying such common traits of basic significance in virulence that are conserved on evolutionarily distant classes of hosts (Cao et al., 2001; Rahme et al., 1995).

To our knowledge, the only trans-kingdom pathogen model reported to date in fungi is *F. oxysporum* isolate FGSC 9935, which was previously shown to kill both tomato plants and immunodepressed

Table 3Overview of the virulence phenotypes of *F. oxysporum* strains on insect, mammalian and plant host models.

Strain	<i>Galleria mellonella</i> median killing time ^a	Virulence on immunodepressed mice ^b	Virulence on tomato plants ^b
FGSC 9935	2 days	Fully virulent (Ortoneda et al., 2004)	Fully virulent (Di Pietro and Roncero, 1998)
$\Delta fmk1$	2 days	Fully virulent (Ortoneda et al., 2004)	Non-pathogenic (Di Pietro et al., 2001)
$\Delta fgb1$	5.5 days ^c	Slightly attenuated (Prados-Rosales et al., 2006)	Strongly reduced (Delgado-Jarana et al., 2005)
$\Delta fmk1 \Delta fgb1$	7.5 days ^c	Strongly reduced (Prados-Rosales et al., 2006)	Non-pathogenic (Delgado-Jarana et al., 2005)
$\Delta pacC$	3 days ^c	Strongly reduced (Ortoneda et al., 2004)	Fully virulent (Caracuel et al., 2003)
$\Delta wc-1$	1.5 days	Reduced (Ruiz-Roldan et al., 2008)	Fully virulent (Ruiz-Roldan et al., 2008)
$\Delta gas1$	2 days	Fully virulent (Martinez-Rocha et al., 2008)	Non-pathogenic (Caracuel et al., 2005)

^a Median killing time at 30 °C was calculated by Kaplan–Meyer test using Graph Pad Prism software, version 3.5 for Windows.^b Results obtained in previous studies (see indicated references).^c $P < 0.05$ versus FGSC 9935.

mice (Ortoneda et al., 2004; Prados-Rosales et al., 2006; Ruiz-Roldan et al., 2008). In this work we tested the potential of the greater wax-moth *G. mellonella* to serve as a non-vertebrate animal host model for *F. oxysporum*. *G. mellonella* was chosen because it has several advantages over other non-vertebrate infection systems such as *Drosophila melanogaster* or *Caenorhabditis elegans*. The larvae are commercially available, they can be easily stored at room temperature and they do not need to be propagated in the lab. *G. mellonella* also has a relatively complex innate immune response which is lacking in *C. elegans* (Kavanagh and Reeves, 2004). Thus, *G. mellonella* could represent a useful alternative to the more expensive and ethically controversial mouse model.

Our results show that *F. oxysporum* isolate FGSC 9935 is able to proliferate in *G. mellonella* larvae and kill the host when injected into the hemocoel. The minimal size of fungal inoculum required for killing by *F. oxysporum* was 10^3 cfu/larva. This is similar to inoculum sizes reported in *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2005) and *Aspergillus fumigatus* (Slater et al., 2010), but considerably lower than those in *C. albicans* (Brennan et al., 2002). *F. oxysporum* proliferation in *G. mellonella* was associated with a strong melanization reaction, which results from the cleavage of prophenoloxidase to the active enzyme and has been reported as part of the insect immune response (Kavanagh and Reeves, 2004). Once *F. oxysporum* had killed the larvae, the fungus aggressively colonized the dead bodies suggesting that it is able to use the insects saprophytically as a source of nutrients. Different members of the genus *Fusarium*, including *F. oxysporum* have previously been reported as insect pathogens (Teetor-Barsch and Roberts, 1983). However, unlike specific insect pathogens such as *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (St. Leger et al., 1996), *F. oxysporum* is generally not able to cross the insect cuticle, suggesting that it lacks gene functions essential for cuticle penetration. Therefore its virulence on *G. mellonella* depends on the injection of fungal cells into the hemocoel, similar to other human pathogens such as *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2005), *A. fumigatus* (Slater et al., 2010) and *C. albicans* (Brennan et al., 2002). The availability of the complete genome sequences of *M. anisopliae* (Gao et al., 2011) and *F. oxysporum* (Ma et al., 2010) will allow comparison of the genetic toolboxes of a specific entomopathogen and a generalist trans-kingdom pathogen.

A key limiting factor for fungal infection of mammals is the high body temperature of the host (Robert and Casadevall, 2009). In contrast to other non-vertebrate models such as *C. elegans*, the *G. mellonella* system is amenable to experiments addressing the effect of temperature on fungal virulence, because wax worm larvae can be maintained at temperatures up to 37 °C. We noted that killing of *G. mellonella* by *F. oxysporum* was significantly more severe at 30 °C than at 37 °C. This result most likely reflects the previous finding that hyphal growth of *F. oxysporum* occurs much faster at 30 °C than at 37 °C (Martinez-Rocha et al., 2008). By contrast, in the human pathogen *C. neoformans* which is well adapted to growth

at high temperatures, killing of *G. mellonella* was more severe at 37 °C than at 30 °C (Mylonakis et al., 2005). Our finding may be of clinical relevance, since it was previously suggested that the limited ability to grow at high temperatures could contribute to the preference of *F. oxysporum* in causing localized skin infections, compared to a relatively low incidence of systemic infections (Nucci and Anaissie, 2002).

To represent a useful alternative model, a non-vertebrate host system must provide a significant degree of correlation with the mouse model. Insects and mammals share similarities in terms of innate immune responses, including phagocytic cells which are important for defense against fungal infections (Mylonakis et al., 2005). In the present study, six gene knockout mutants of *F. oxysporum* were tested on *G. mellonella*, and five of these showed a virulence pattern in the insect model which was similar to that previously reported on immunodepressed mice (Table 3). These include two mutants ($\Delta fmk1$ and $\Delta gas1$) that were as virulent as the wild type in both models and three ($\Delta pacC$, $\Delta fgb1$ and $\Delta fmk1 \Delta fgb1$) with significantly attenuated virulence on *G. mellonella* and mice. By contrast, there was no correlation between virulence of the fungal mutants on *Galleria* and on tomato plants (Table 3). This finding is in agreement with a previous study in *P. aeruginosa*, reporting a much higher correlation of the virulence pattern of bacterial mutants on *G. mellonella* and mice as compared to mice and plants or nematodes and plants (Jander et al., 2000). The results further support the idea that fungal infection on vertebrate and non-vertebrate animal hosts shares common mechanisms, while pathogenicity on plants and animals has distinct evolutionary origins (Ortoneda et al., 2004).

A relatively high correlation between virulence on *G. mellonella* and the mouse infection model was also reported in mutants of other fungal pathogens such as *C. albicans* (Brennan et al., 2002), *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2005) or *A. fumigatus* (Slater et al., 2010). However, it is important to note that one of the six *F. oxysporum* mutants tested, $\Delta wc-1$, was as virulent as the wild type strain on *G. mellonella*, but had previously shown reduced virulence on immunodepressed mice (Ruiz-Roldan et al., 2008). This case of discrepancy suggests that, in spite of the important parallels between vertebrate and non-vertebrate host systems, there are also major differences. For example, non-vertebrate models lack an adaptive immune system which is present in mammals (Kavanagh and Reeves, 2004). Some key virulence mechanisms important for mammalian infection may thus remain undetected in the *G. mellonella* model.

In spite of these potential limitations, our results indicate that *G. mellonella* can serve as a high-throughput, cost-effective and ethically acceptable system for testing animal pathogenicity in *F. oxysporum*. Pre-screening of fungal mutants on *G. mellonella* could significantly reduce the number of mice required to assess changes in virulence, thereby improving the usefulness of *F. oxysporum* as a model for studying fungal pathogenicity on taxonomically distant hosts.

Acknowledgments

The research in our laboratory was supported by Grants BIO2008-04479-E, EUI2009-03942 and BIO2010-15505 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by Excellence Grant BIO-3847 from Junta de Andalucía and by the Marie Curie Initial Training Network ARIADNE (FP7-PEOPLE-ITN-237936). G.V.N. has a PhD fellowship from IFARHU, Panama. R.P.R. and A.O.U. had PhD fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, CA.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Cook, R. (Ed.), *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Penn State University Press, University Park, PA, pp. 391–399.
- Azor, M. et al., 2009. High genetic diversity and poor in vitro response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1152–1155.
- Brennan, M. et al., 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 153–157.
- Cao, H. et al., 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 259–284.
- Caracuel, Z. et al., 2005. *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1140–1147.
- Caracuel, Z. et al., 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48, 765–779.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., 1995. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft, The Netherlands.
- Delgado-Jarana, J. et al., 2005. *Fusarium oxysporum* G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genet. Biol.* 42, 61–72.
- Di Pietro, A. et al., 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39, 1140–1152.
- Di Pietro, A. et al., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* 4, 315–326.
- Di Pietro, A., Roncero, M.I., 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pgI* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 91–98.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S.H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X.Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L.J., St. Leger, R.J., Zhao, G.P., Pei, Y., Feng, M.G., Xia, Y., Wang, C., 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet.* 7, e1001264.
- Guarro, J., Gene, J., 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 741–754.
- Jander, G. et al., 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* 182, 3843–3845.
- Kavanagh, K., Reeves, E.P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112.
- Lopez-Berges, M.S. et al., 2009. Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Mol. Plant Pathol.* 10, 95–107.
- Ma, L.J. et al., 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464, 367–373.
- Martinez-Rocha, A.L. et al., 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol.* 10, 1339–13351.
- Michielse, C.B. et al., 2009. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol.* 10, R4.
- Mylonakis, E. et al., 2005. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 73, 3842–3850.
- Nucci, M., Anaissie, E., 2002. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* 35, 909–920.
- Nucci, M., Anaissie, E., 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695–704.
- O'Donnell, K. et al., 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5109–5120.
- Ortoneda, M. et al., 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun.* 72, 1760–1766.
- Pradel, E., Ewbank, J.J., 2004. Genetic models in pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 38, 347–363.
- Prados-Rosales, R.C. et al., 2006. Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes Infect.* 8, 2825–2831.
- Rahme, L.G. et al., 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899–1902.
- Robert, V.A., Casadevall, A., 2009. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J. Infect. Dis.* 200, 1623–1626.
- Ruiz-Roldan, M.C. et al., 2008. Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell.* 7, 1227–1230.
- Slater, J.L. et al., 2010. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med. Mycol.*
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W., Roberts, D.W., 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 907–912.
- Teeter-Barsch, G.H., Roberts, D.W., 1983. Entomogenous *Fusarium* species. *Mycopathologia* 84, 3–16.
- Tojo, S. et al., 2000. Involvement of both granular cells and plasmacytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 46, 1129–1135.
- Zhang, N. et al., 2006. 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.