



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias  
Departamento de Genética

# **Papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 en la virulencia de *Fusarium oxysporum***

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

**Cristina de Miguel Rojas**

Dirigido por:

**Dra. M<sup>a</sup> Concepción de la Hera Díaz de Liaño**

Profesora Titular

Córdoba, 2014

TITULO: *Papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 en la virulencia de Fusarium oxysporum*

AUTOR: *Cristina de Miguel Rojas*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS: Papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 en la virulencia de *Fusarium oxysporum***

**DOCTORANDO/A:** Cristina de Miguel Rojas

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

La Tesis Doctoral de Dña. Cristina de Miguel Rojas se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, en el seno del Grupo "Genética molecular de la patogénesis fúngica" (BIO-3138). Su desarrollo ha permitido al doctorando adquirir una sólida formación en Genética y Biología Molecular. Durante la realización de la Tesis, Dña. Cristina ha mostrado tener una gran capacidad de trabajo y aptitud para la investigación científica. El trabajo realizado ha permitido identificar dos efectores moleculares implicados en la patogénesis del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Los resultados obtenidos se han comunicado en varios congresos nacionales e internacionales, y se han recogido en la siguiente publicación:

Miguel-Rojas C, Hera C (2013) Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCF-mediated proteolysis pathway in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* **14**: 12

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

Dra. M<sup>a</sup> Concepción de la Hera

Córdoba, 3 de marzo de 2014



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2007-62661, BIO2010-15505). CMR ha sido beneficiaria de una beca predoctoral FPU del MEC.



A mi familia









**Índices**



# Índice de contenidos

<b>Índices</b> .....	<b>XI</b>
Índice de contenidos .....	XIII
Índice de figuras .....	XVII
Índice de tablas .....	XIX
Abreviaturas y acrónimos.....	XXI
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>1. El género <i>Fusarium</i></b> .....	<b>11</b>
1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	11
1.2. Biología .....	12
1.3. Ciclo de vida.....	13
1.4. El proceso de infección .....	14
1.5. Desarrollo y control de la fusariosis vascular .....	16
1.6. Mecanismos de infección .....	17
1.7. Mecanismos de defensa de la planta .....	18
1.8. Interacción planta-patógeno .....	19
1.9. Genes fúngicos esenciales para la patogénesis.....	21
<b>2. Modificaciones proteicas señalizadoras: ubiquitinación y fosforilación como reguladores moleculares</b> .....	<b>23</b>
2.1. Ubiquitinación y degradación proteica .....	23
2.2. Ligasas de ubiquitina: Complejo SCF .....	25
2.3. Proteínas F-box .....	26
2.4. Proteínas F-box en patógenos fúngicos.....	27
2.5. Fosforilación y cascadas de transducción de señales.....	29
<b>3. Proteínas 14-3-3</b> .....	<b>32</b>
3.1. Estructura y dimerización .....	32
3.2. Modelos de acción.....	35
3.3. Proteínas 14-3-3 en levaduras .....	36
3.4. Regulación de la actividad .....	36
<b>Objetivos</b> .....	<b>39</b>

<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>43</b>
<b>1. Materiales .....</b>	<b>45</b>
1.1. Material biológico .....	45
1.2. Vectores de clonación.....	46
1.3. Medios de cultivo.....	46
1.4. Compuestos químicos, enzimas, anticuerpos y kits comerciales .....	48
1.5. Oligonucleótidos sintéticos.....	52
1.6. Programas informáticos y páginas webs .....	54
1.7. Instrumentación.....	55
<b>2. Métodos .....</b>	<b>56</b>
2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos .....	56
2.2. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	57
2.3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	60
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	63
2.5. Transformación genética .....	69
2.6. Ensayos de patogenicidad.....	72
2.7. Ensayos fenotípicos .....	74
2.8. Ensayos de fusión vegetativa.....	75
2.9. Manipulación y análisis de proteínas.....	77
2.10. Microscopía.....	84
2.11. Análisis bioinformáticos.....	85
<b>Resultados.....</b>	<b>87</b>
<b>1. Fbp1, una proteína F-box conservada en hongos.....</b>	<b>89</b>
1.1. Identificación, análisis y expresión del gen <i>fbp1</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. lycopersici</i> .....	89
1.2. Interrupción dirigida del gen <i>fbp1</i> (FOXG_04438).....	91
1.3. Fbp1 está implicada en el crecimiento direccional en medio sólido.....	93
1.4. Fbp1 contribuye a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> .....	95
1.5. Fbp1 contribuye al crecimiento en medio sólido .....	96
1.6. La mutación $\Delta fbp1$ reduce la expresión de hidrofobinas disminuyendo la hidrofobicidad de la colonia.....	98
1.7. Fbp1 está implicada en la fusión de hifas, adhesión a raíz y crecimiento invasivo. ....	99
1.8. Expresión de enzimas pectinolíticas reguladas por Fbp1 .....	103
1.9. Fbp1 es necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta de integridad celular .....	105
1.10. Fosfatasa PP2C con dominios PEST.....	106

<b>2. Identificación proteómica de posibles dianas reguladas por el sistema SCF<sup>Fbp1</sup> ...</b>	<b>109</b>
2.1. Perfil proteico, por electroforesis bidimensional, de la cepa silvestre y el mutante <i>Δfbp1</i> .....	109
2.2. Proteínas sobre-expresadas en el mutante <i>Δfbp1</i> .....	114
2.3. Proteínas sub-expresadas en el mutante <i>Δfbp1</i> .....	115
<b>3. Bmh1 y Bmh2 son dos proteínas 14-3-3 con diferentes funciones en <i>F. oxysporum</i> .....</b>	<b>118</b>
3.1. Identificación y análisis de proteínas 14-3-3 en <i>Fusarium</i> . .....	118
3.2. Obtención de estirpes mutantes en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	120
3.3. Estructura tridimensional de proteínas Bmh1/2 en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	125
3.4. Expresión de las proteínas Bmh1/2 en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	126
3.5. El mutante <i>Δbhm2</i> está afectado en la utilización de nutrientes.....	127
3.6. Bmh2 interviene en la vía de sensibilidad a rapamicina .....	129
3.7. Bmh2 está implicada en morfogénesis y crecimiento invasivo.....	130
3.8. Las mutaciones <i>Δbhm1</i> y <i>Δbhm2</i> no afectan a la hidrofobicidad de la colonia.....	135
3.9. Bmh2 incrementa la resistencia a estrés térmico pero no está implicada en la vía de integridad celular .....	135
3.10. Bmh2 contribuye a la virulencia de <i>F. oxysporum</i> .....	137
3.11. Complementación de <i>Δbhm2</i> con un alelo <i>bmh1A188S</i> .....	139
<b>Discusión .....</b>	<b>141</b>
1. Fbp1 participa en la infección y en la integridad celular a través de rutas de señalización MAPK .....	143
2. Análisis proteómico .....	146
3. Bmh2 <i>versus</i> Bmh1 .....	148
<b>Conclusiones .....</b>	<b>153</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>157</b>
<b>Publicaciones .....</b>	<b>181</b>





## Índice de figuras

Figura 1.	Esporas de <i>Fusarium</i> .	12
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> .	14
Figura 3.	Estadios de la infección de <i>F. oxysporum</i> en planta de tomate expresando la proteína fluorescente GFP.	15
Figura 4.	Complejo SCF y ubiquitinación de proteínas.	25
Figura 5.	Rutas MAPK en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	30
Figura 6.	Estructura cristalina de la isoforma 14-3-3 $\zeta$ de humanos.	33
Figura 7.	Modelo de unión ligando-proteína 14-3-3.	34
Figura 8.	Ejemplos de los modelos de acción de las proteínas 14-3-3.	35
Figura 9.	Construcción de un alelo interrumpido mediante PCR de fusión.	65
Figura 10.	Esquema de interrupción génica mediante la técnica de <i>Split Marker</i> .	66
Figura 11.	Distintos estadios de la fusariosis vascular en plantas de tomate.	73
Figura 12.	El producto génico de <i>fbp1</i> en <i>F. oxysporum</i> representa una proteína F-box conservada en hongos.	90
Figura 13.	Expresión de <i>fbp1</i> bajo distintas condiciones de crecimiento.	91
Figura 14.	Interrupción dirigida del gen <i>fbp1</i> .	92
Figura 15.	Arquitectura de la colonia en medio sólido.	93
Figura 16.	Efecto de la delección de <i>fbp1</i> sobre el crecimiento direccional de las hifas.	94
Figura 17.	Efecto de la azida sódica sobre la tinción con FM4-64.	95
Figura 18.	Fbp1 es esencial para la completa virulencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.	96
Figura 19.	Crecimiento en medio líquido.	97
Figura 20.	Efecto de la delección de <i>fbp1</i> en la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.	97
Figura 21.	Fbp1 contribuye a la hidrofobicidad de la colonia.	99
Figura 22.	Fbp1 regula la fusión vegetativa de hifas.	100
Figura 23.	Fbp1 regula la adhesión al hospedador.	102
Figura 24.	Fbp1 es requerida para el crecimiento invasivo y contribuye a la fosforilación de Fmk1.	103
Figura 25.	<i>fbp1</i> controla la expresión de FOXG_12535.	104
Figura 26.	Fbp1 es esencial para la integridad celular.	106
Figura 27.	Efecto de la delección de <i>fbp1</i> en la utilización de LiCl.	108
Figura 28.	Imágenes de extractos proteicos de la cepa silvestre y la cepa mutante $\Delta fbp1$ sometidos a electroforesis bidimensional.	109
Figura 29.	Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.	113

Figura 30.	Análisis filogenético de proteínas 14-3-3.....	119
Figura 31.	Alineamiento de las proteínas 14-3-3 del género <i>Fusarium</i> .....	120
Figura 32.	Interrupción dirigida del gen <i>bmh2</i> . ....	122
Figura 33.	Interrupción dirigida del gen <i>bmh1</i> . ....	123
Figura 34.	Marcaje de la proteína Bmh2 con 3XFLAG. ....	124
Figura 35.	Modelo tridimensional teórico de las proteínas Bmh1/2 de <i>F. oxysporum</i> .....	126
Figura 36.	Expresión de <i>bmh1</i> y <i>bmh2</i> .....	127
Figura 37.	Efecto de la delección de <i>bmh2</i> y <i>bmh1</i> en la utilización de fuentes de carbono. ....	128
Figura 38.	Efecto de la delección de <i>bmh2</i> y <i>bmh1</i> en la utilización de fuentes de nitrógeno. .....	129
Figura 39.	La delección de <i>bmh2</i> aumenta la sensibilidad a rapamicina. ....	130
Figura 40.	Efecto del sorbitol y NaCl en la morfología de los mutantes $\Delta b m h 2$ .....	131
Figura 41.	Efecto del sorbitol en la morfología de la colonia. ....	132
Figura 42.	La represión del crecimiento invasivo por amonio está regulada por <i>bmh2</i> .....	134
Figura 43.	Carácter hidrofóbico de los mutantes $\Delta b m h 1$ y $\Delta b m h 2$ . ....	135
Figura 44.	Efecto de los distintos tipos de estrés sobre las mutaciones $\Delta b m 1$ y $\Delta b m h 2$ . ....	136
Figura 45.	La mutación $\Delta b m h 2$ confiere resistencia a altas temperaturas.....	137
Figura 46.	<i>bmh2</i> pero no <i>bmh1</i> interviene en la patogénesis de <i>F. oxysporum</i> . ....	139
Figura 47.	Fluorograma transformante $\Delta b m h 2 / b m h 1 A 188 S$ . ....	140

## Índice de tablas

Tabla 1.	Razas existentes en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	20
Tabla 2.	Genes de <i>F. oxysporum</i> con efecto en patogénesis vegetal.....	22
Tabla 3.	Cepas bacterianas.....	45
Tabla 4.	Cepas fúngicas .....	45
Tabla 5.	Cultivares usados en el presente estudio .....	46
Tabla 6.	Vectores de clonación .....	46
Tabla 7.	Compuestos químicos usados en este trabajo .....	48
Tabla 8.	Oligonucleótidos generales .....	52
Tabla 9.	Oligonucleótidos específicos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	53
Tabla 10.	Programas informáticos y páginas webs para el análisis de datos.....	54
Tabla 11.	Instrumentación .....	55
Tabla 12.	Condiciones estándar de la PCR. ....	63
Tabla 13.	Condiciones de amplificación de la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión génica.....	68
Tabla 14.	Fenotipo de los mutantes <i>nit</i> en medio mínimo Puhalla con diferentes fuentes de nitrógeno .....	76
Tabla 15.	Frecuencia de fusión vegetativa.....	101
Tabla 16.	Proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa mutante $\Delta fbp1$ y la cepa silvestre identificadas por MALDI-TOF/TOF. ....	111
Tabla 17.	Proteínas identificadas en este estudio que previamente han sido encontradas ubiquitinadas.....	117



## Abreviaturas y acrónimos

**aa:** Aminoácidos

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN copia

**ADNg:** ADN genómico

**ADNp:** ADN plasmídico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ATA:** Ácido aurín-tricarboxílico, del inglés ("AurinTricarboxylic Acid")

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BSA:** seroalbúmina bovina (del inglés "Bovine Serum Albumin)

**cAMP:** adenosín monofosfato cíclico

**CDK:** Quinasa dependiente de ciclina (del inglés "Cyclin Dependent Kinases)

**CFW:** Blanco de calcoflúor (del inglés, "CalcoFluor White")

**CR:** Rojo congo (del inglés, "Congo Red")

**DIC:** Técnica de iluminación microscópica (del inglés "Differential interference contrast")

**DNAasa:** enzima desoxirribonucleasa

**dNTPs:** Deoxinucleótidos trifosfato (del inglés, "deoxyNucleotide TriPhosphate")

**EROs:** Especies reactivas de oxígeno

**HR:** Respuesta hipersensible (del inglés, "Hypersensitive Response")

**Hyg<sup>r</sup>:** Casete de resistencia a higromicina

**IEF:** isoelectroenfoque

**IPG:** tiras con gradiente de pH inmobilizado (del inglés "Immobilized pH Gel)

**kb:** Kilobase(s)

**KDa:** Kilodalton

**LA:** (Medio) Luria-Bertani agar

**LB:** (Medio) Luria-Bertani

**LRR:** Domio rico en repeticiones de leucina (del inglés, "Leucine-rich repeat")

**M:** Marcador de peso molecular

**MALDI:** desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization")

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, "Mitogen-Activated Protein Kinase")

**MM:** Medio mínimo

**MMP:** Medio mínimo Puhalla

**MS:** Espectrometría de masas (del inglés, "Mass Spectrometry")

**MS/MS:** espectrometría de masas en tándem

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

**pb:** Pares de bases

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

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

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

**PGA:** Medio con ácido poligalacturónico (del inglés, "PolyGalacturonic Acid")

**Phleo<sup>r</sup>:** Casete de resistencia a fleomicina

**PM:** peso molecular

**RNAasa:** enzima ribonucleasa

**rpm:** revoluciones por minuto

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

**p/v:** Relación peso/volumen

**qPCR:** PCR cuantitativa (del inglés "quantitative polymerase chain reaction")

**SAR:** Respuesta sistémica adquirida (del inglés, "Systemic Acquired Resistance")

**SAP:** Fosfatasa alcalina de gamba (del inglés, "Shrimp Alkaline Phosphatase")

**SCF:** ligasa de ubiquitina E3 (del inglés "Skp, Cullin, E-box")

**SDS:** Dodecilsulfato sódico (del inglés, "Sodium Dodecyl Sulfate")

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés "Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis")

**SpK:** Spitzenkörper

**TOR:** Diana de la rapamicina (del inglés, "Target Of Rapamycin")

**U:** unidad de actividad enzimática

**v/v:** Relación volumen/volumen

**wt:** Cepa silvestre (del inglés "wild type")

**X-Gal:** 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -Dgalactopiranosido

**YPGA:** Medio sólido con extracto de levadura, peptona, glucosa y agar (del inglés, "Yeast extract Peptone Glucose Agar")

**Resumen**





La rápida y específica degradación de proteínas por el sistema proteosoma-ubiquitina ha emergido como un importante mecanismo de regulación en eucariotas. Algunos de los procesos básicos celulares regulados por proteólisis dependiente de ubiquitina incluyen la progresión del ciclo celular, iniciación de la transcripción o transducción de señales. Las enzimas clave en el proceso de ubiquitinación son las ligasas de ubiquitina E3, puesto que son las que actúan como moduladores para el reconocimiento del sustrato y además son las que transfieren la ubiquitina activada a dicho sustrato. Las proteínas Skp1, Cul1 y la proteína F-box (SCF) son el grupo de ligasas E3 mejor conocido. Dada la importancia de dicho proceso, resultó de gran interés investigar el papel de las proteínas pertenecientes a la maquinaria de renovación proteica, en la patogénesis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de una proteína F-box, Fbp1, ortóloga de GRR1 en *S. cerevisiae*. Para estudiar el papel del gen *fbp1* en la virulencia de *F. oxysporum* se ha llevado a cabo la interrupción dirigida del gen en la estirpe silvestre del hongo. La infección de plantas de tomate inoculadas con los mutantes deficientes en el gen mostró un retraso en el proceso de infección, lo que indica que Fbp1, aunque no es esencial para la patogenicidad, es necesaria para la completa virulencia de *F.oxysporum*. El mutante  $\Delta fbp1$  presentó un retraso significativo en todas las fuentes de carbono y nitrógeno analizadas, además de un patrón de crecimiento ondulado de las hifas líder y una tinción del Spk muy abundante y deslocalizada. Mutantes de *F. oxysporum* en el gen *fbp1* mostraron niveles reducidos de fosforilación de Fmk1 y compartían características fenotípicas con los mutantes  $\Delta fmk1$ , tales como defectos en el crecimiento invasivo, en la colonización del tejido vivo de la planta y en la capacidad de fusión vegetativa. Por otro lado, los bajos niveles de fosforilación de la MAPK Mpk1 que exhibió el mutante nulo *fbp1* junto con la sensibilidad a compuestos como SDS y CFW, sugieren que Fbp1 contribuye al mantenimiento de la integridad celular.

Realizamos un análisis proteómico, en condiciones de crecimiento invasivo, para conocer las proteínas diferencialmente expresadas en la cepa mutante  $\Delta fbp1$  y poder así identificar posibles dianas del complejo SCF<sup>Fbp1</sup>. De las 41 proteínas identificadas, 17 de ellas estaban sobre-expresadas en el mutante *fbp1* y relacionadas con funciones susceptibles de sufrir ubiquitinación: transporte, proteólisis, respuesta a estrés y organización de los componentes celulares.

Una de las proteínas más sobre-expresadas en el mutante *fbp1* fue la codificada por el gen FOXG\_00146, una proteína 14-3-3 anotada en la base de datos como Bmh2. Las proteínas 14-3-3 son proteínas diméricas, altamente conservadas e implicadas en una gran cantidad de funciones celulares. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* reveló la existencia de dos proteínas 14-3-3, Bmh1 (FOXG\_01979) y Bmh2 (FOXG\_00146). Ambas proteínas presentan una gran similitud, sin embargo la interrupción dirigida de ambos genes mostró que Bmh1 no parece tener ningún papel en los fenotipos analizados. Bmh2 participa en la resistencia a rapamicina y su delección supone una reducción del crecimiento en los distintos medios analizados, por lo que sugerimos que el mutante  $\Delta bmh2$  tiene afectada la ruta de señalización TOR. La pérdida de Bmh2 pero no de Bmh1 resultó en una reducción parcial de la virulencia en plantas de tomate. Aunque Bmh2 no es esencial para el crecimiento invasivo, si parece jugar un papel importante ya que un mutante con la proteína Bmh2 truncada (carece de la  $\alpha$ -hélice 9) fue capaz de atravesar la membrana de celofán incluso en presencia de amonio, a diferencia del mutante  $\Delta bmh2$ .

**Abstract**



Fast and specific degradation proteins by the ubiquitin-proteasome system have recently emerged as a major regulatory mechanism of cellular function in eukaryotes. Some basic cellular processes regulated by ubiquitin proteasome system are cell cycle, signal transduction and transcription. The key enzymes in the ubiquitination process are the E3 ubiquitin ligases, because the function as the substrate recognition module of the system and are capable of transferring the activated ubiquitin to the substrate. Spk1, Cul1 and F-box protein (SCF) E3 ligases are among the best-understood ligases. Given the importance of this process, it was of great interest investigating the role of proteins belonging to the protein turnover machinery and their contribution to *Fusarium oxysporum* pathogenicity.

In this study, we have focused in the study of an F-box protein called Fbp1 which encodes the orthologue of *S. cerevisiae* GRR1 gene. In order to investigate the role Fbp1 in pathogenicity of *F. oxysporum* we performed a targeted disruption of *fbp1* gene. Disease progression on tomato plant inoculated with  $\Delta fbp1$  mutant showed reduced virulence suggesting that Fbp1 is essential for full virulence in *F.oxysporum*. The  $\Delta fbp1$  mutant showed reduced hyphal growth on all carbon and nitrogen sources analysed. In the mutant strain, leader hyphae displayed a zig-zag growth phenotype and an abundant and delocalized staining Spk. *F. oxysporum* strains lacking  $\Delta fbp1$  had a reduced phosphorylation levels of Fmk1 and shared characteristic phenotypes with  $\Delta fmk1$  mutants, including defects in hyphal growth under nutrient-limited conditions, invasion of the underlying substrate and colonization of living plant tissue. Interestingly, low phosphorylation levels of Mpk1 and hypersensitivity to cell wall targeting compounds like CFW and SDS showed  $\Delta fbp1$  mutant, suggesting that Fbp1 contributes to cell wall integrity via a MAPK Mpk1 pathway.

In order to know differentially expressed proteins in  $\Delta fbp1$  mutant invasion-growth conditions, we carried out a proteomic approach to identify the target proteins of SCF<sup>Fbp1</sup> complex. 17 of the 41 proteins differentially expressed in the present work were up-regulated in the  $\Delta fbp1$  mutant and they were related with process susceptible to be ubiquitinated: transport, proteolysis, response to stress and cellular component organization.

One of the most abundant protein in the  $\Delta fbp1$  mutant was the FOXG\_0146 gene, a 14-3-3 protein annotated in the *Fusarium* database like Bmh2. 14-3-3 proteins are dimeric and highly conserved proteins which are involved in a many cellular

process. In silico analysis of *F. oxysporum* genome showed two 14-3-3 proteins, Bmh1 (FOXG\_01979) y Bmh2 (FOXG\_00146). Both proteins revealed high identity but the targeted deletion showed that Bmh1 has not any roles at reviewed assays. Bmh2 is involved in rapamycin resistant and knock-out mutant showed reduced hyphal growth on all sources analysed, so we suggest that  $\Delta bmh2$  mutant is impaired in TOR signalling.  $\Delta bmh2$  mutant but not  $\Delta bmh1$  mutant showed reduced virulence. Bmh2 is not required for invasive growth; however seems to play an important role in virulence-related functions repressed by the preferred nitrogen source ammonium. In fact, the  $bmh2_{\Delta 210-276}$  was able to cross cellophane membrane in contrast with  $\Delta bmh2$  mutant.

# **Introducción**





## 1. El género *Fusarium*

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

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

### 1.1. *Fusarium oxysporum*

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

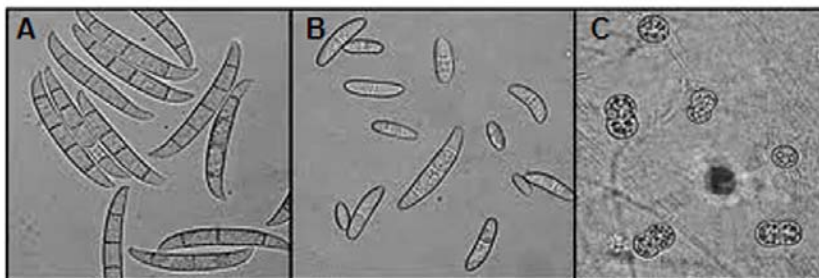
En 1940, Snyder y Hansen definieron el concepto *forma specialis* (f. sp) para referirse a cada aislado de *F. oxysporum* con capacidad de infectar una determinada

especie, género o grupo vegetal. Por ejemplo, la cepa empleada en este trabajo es patógena del tomate (*Lycopersicon esculentum*) y se denomina *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Hoy en día, el concepto de *forma specialis* sigue en uso y aunque algunas infectan a un hospedador único, para otras el rango es más amplio y actúan sobre un grupo restringido de especies vegetales (Burnett, 1984).

Las relaciones filogenéticas entre aislados han demostrado que la capacidad para infectar una especie vegetal ha surgido independientemente varias veces a lo largo de la evolución (Baayen et al, 2000; O'Donnell et al, 1998). Este fenómeno se relaciona con la existencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en el genoma de determinadas estirpes, que son portadoras de genes relacionados con patogénesis que confieren especificidad para el hospedador (Ma et al, 2010). Por ejemplo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* posee cuatro cromosomas singulares y únicos de ella (3, 6, 14 y 15), del total de quince. La considerable variación genética observada en este hongo con reproducción asexual se atribuye a mecanismos alternativos como el movimiento de transposones (Daboussi & Capy, 2003) o la formación de heterocariontes (Teunissen et al, 2002).

## 1.2. Biología

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



**Figura 1. Esporas de *Fusarium*.** (A) Macroconidios. (B) Microconidios. (C) Clamidosporas.

Los microconidios, con una o dos células, son los más abundantes y se producen con mayor frecuencia en cualquier circunstancia. Presentan formas ovaladas y cilíndricas. Los macroconidios aunque son las esporas típicas del género, son las menos abundantes. De aspecto fusiforme, están constituidas por un número de células que oscila entre tres y cinco, son septadas, puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las clamidosporas, de una o dos células, presentan una forma esférica y tienen una pared engrosada. Se originan por la modificación de un segmento de la hifa cuya función, más que propagación, es la supervivencia durante largos periodos de tiempo (Agrios, 1997).

*F. oxysporum* se propaga en distancias cortas principalmente por irrigación con agua o por equipos contaminados, y puede extenderse a largas distancias en forma de esporas transportadas por el viento (Agrios, 1997) encontrándose prácticamente en todos los ecosistemas terrestres.

### 1.3. Ciclo de vida

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

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

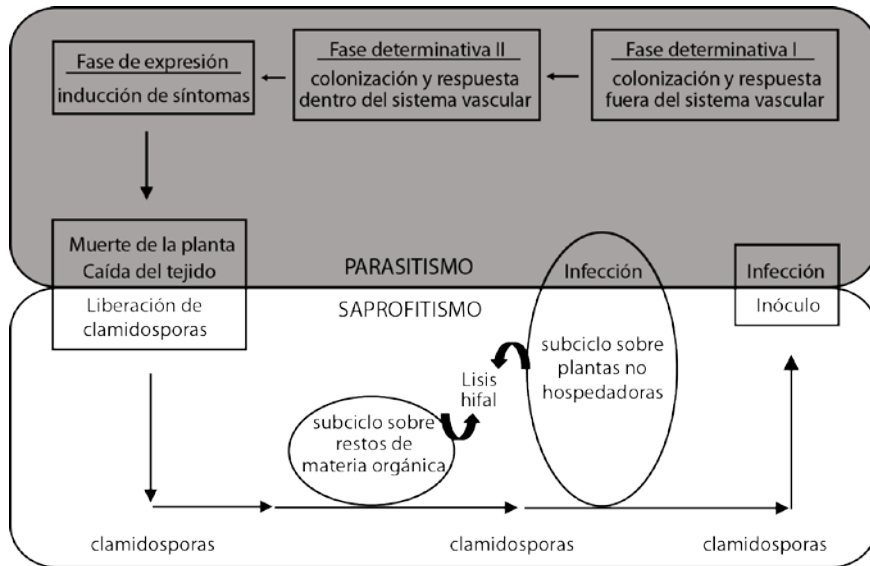
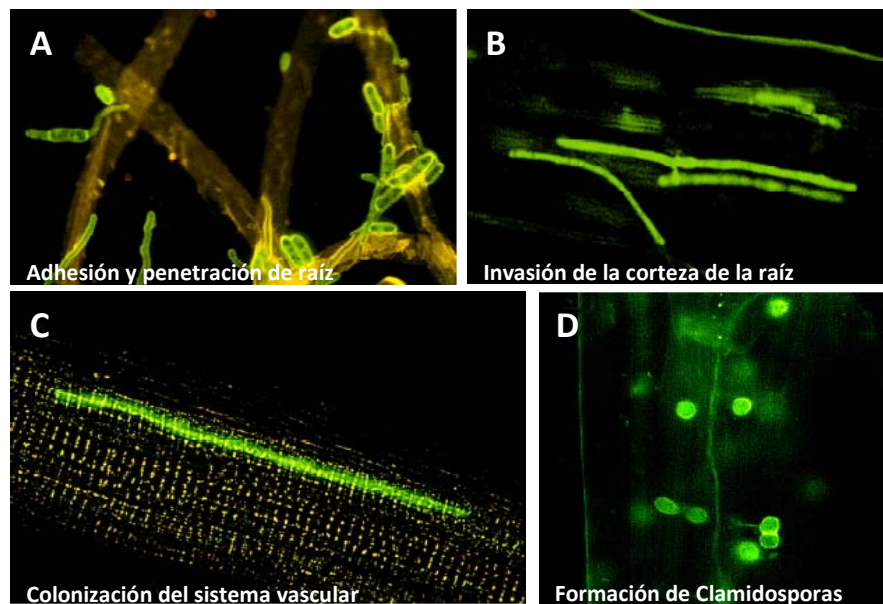


Figura 2. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum*. Adaptado de (Beckman, 1987).

#### 1.4. El proceso de infección

La especie *F. oxysporum* es capaz de detectar la presencia de una planta hospedadora incluso antes de establecer un contacto físico. Esto se debe, muy probablemente, a que los exudados de las raíces ponen en marcha las rutas de transducción de señales del hongo y éste responde mediante la activación de los genes apropiados que regulan el desarrollo y la virulencia del mismo. Actualmente se conocen dos tipos de rutas: la cascada de la adenosina monofosfato-proteína quinasa A (AMPc-PKA) y la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Di Pietro et al, 2001).

Tras la adhesión de las esporas a la superficie de la raíz (figura 3A), se forma una densa red de hifas que parece necesaria para iniciar la penetración (Czymmek et al, 2007; Olivain & Alabouvette, 1999; Rodriguez-Galvez & Mendgen, 1995). La microscopía electrónica ha demostrado la inexistencia de apresorios o hifas especiales de penetración en *F. oxysporum* (Olivain & Alabouvette, 1999), así como la formación de hifas que penetran la pared de las células epidérmicas y la formación de un septo en el punto de penetración (Pareja Jaime et al, 2010; Perez-Nadales & Di Pietro, 2011).



**Figura 3.** Estadios de la infección de *F. oxysporum* en planta de tomate expresando la proteína fluorescente GFP. (A) Germinación de microconidios y penetración de hifas de la estirpe silvestre adheridas a la superficie de la raíz tras 24 horas de inoculación. (B) Infección de la hifa del hongo creciendo en la corteza de la raíz tras 5 días de infección. (C) Hifas creciendo en el interior de los vasos del xilema tras 7 días de inoculación. (D) Clamidosporas del hongo producidas en el tejido muerto de la planta (Di Pietro et al, 2001).

Por su parte, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil del interior de la planta, poniendo en marcha su maquinaria de ataque mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas) (Di Pietro et al, 2009), la producción de enzimas que degradan los compuestos tóxicos de las plantas como tomatinasas y lacasas y el refuerzo de su pared celular para resistir los daños causados por estas sustancias tóxicas (Cañero & Roncero, 2008; Pareja-Jaime et al, 2008). Tras superar estas defensas, el hongo invade la corteza radical creciendo por los espacios inter- e intracelulares alcanzando los vasos del xilema a través de orificios (figura 3B), y utilizándolos como avenidas para colonizar el tallo y las partes aéreas de la planta (figura 3C). A medida que crece, el micelio se ramifica y produce microconidios, los cuales suben por los vasos gracias a la corriente de savia. El hongo también es capaz de avanzar lateralmente penetrando en los vasos del xilema adyacentes (Agrios, 1997).

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

### 1.5. Desarrollo y control de la fusariosis vascular

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

El patógeno tiene una capacidad limitada para invadir tejidos vivos de la planta. Puede 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 estrés hídrico. Por otro lado, el bloqueo del xilema a menudo se produce por la propia reacción de la planta frente a la invasión. En estos casos, la planta produce una rápida acumulación de geles vasculares pécticos o bien genera estructuras globosas (tilosas), en un intento de contener la proliferación del hongo. Si la infección inicial no es grave y la planta responde rápidamente, logra contenerla en unos cuantos vasos. Si por el contrario la infección inicial es elevada y la respuesta de la planta lenta, ésta es totalmente colonizada y muere. En este caso, el hongo crece desde el xilema hacia los tejidos parenquimáticos y produce muchas clamidosporas (Agrios, 1997).

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 intentan practicar otras medidas de control como son los métodos físicos, químicos o biológicos. Los físicos consisten en la esterilización de las semillas y rotación de los cultivos; éstos son económicos e inocuos para el ambiente pero su eficacia es limitada debido a la amplia distribución y persistencia del hongo en el suelo. Los químicos, como los tratamientos con fungicidas o compuestos activadores de la respuesta sistémica adquirida, son altamente efectivos pero muy costosos y dañinos para el medio ambiente. Y los biológicos, como el empleo de bacterias y hongos antagonistas o la protección cruzada con aislados de *Fusarium* no patógenos. Los conocimientos del control biológico de *Fusarium* se limitan a estudios sobre producción de compuestos y su efecto en la patogénesis (Olivain et al, 2003).

### **1.6. Mecanismos de infección**

Los hongos patógenos 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, son capaces de desarrollar mecanismos activos de penetración, que implican la degradación de las barreras vegetales externas mediante una combinación de procesos enzimáticos y mecánicos (Agrios, 1997).

Los patógenos que penetran la planta por zonas aéreas se encuentran con la cutícula, una capa impermeable de cutina, que debe ser superada mediante la acción enzimática de cutinasas secretadas y/o mediante la formación de estructuras de infección especializadas, como apresorios o tubos de penetración, los cuales proporcionan la presión necesaria para atravesar la superficie exterior (Agrios, 1997). Por el contrario, en patógenos del suelo la primera barrera física es la pared celular. Por tanto, la penetración a través de la raíz requiere la acción de enzimas hidrolíticas como celulasas y pectinasas. Los patógenos fúngicos son muy versátiles en la producción de enzimas extracelulares capaces de degradar la pared celular vegetal, como es el caso de *F. oxysporum* (Di Pietro et al, 2009).

Tras la penetración, los hongos contrarrestan la defensa de la planta secretando toxinas y/o compuestos análogos a hormonas vegetales, como las fitotoxinas, alterando la fisiología de la planta en su propio beneficio. También se ha descrito la producción, por parte del patógeno, de sustancias supresoras llamadas efectores, capaces de anular o disminuir la respuesta de defensa de la planta (Agrios, 1997).



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

Algunas de estas moléculas sintetizadas por los hongos son responsables del establecimiento de la enfermedad, y su carencia causa la ausencia de síntomas (Jackson & Taylor, 1996). Por ello, las moléculas necesarias para la infección se denominan factores de patogenicidad y aquellas que contribuyen a la capacidad de infectar y provocar los síntomas de la enfermedad se denominan factores de virulencia.

### **1.7. Mecanismos de defensa de la planta**

Los mecanismos de defensa de las plantas son diversos y abarcan desde la protección no específica y pasiva que confieren las barreras como la cutícula y la pared celular, hasta respuestas activas y altamente específicas propias de cada hospedador o de un cultivo determinado (Jackson & Taylor, 1996). 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 y proliferación en la planta.

La superficie de la planta, recubierta por cutina, actúa como un impermeabilizante al agua y a los microorganismos, constituyendo la primera línea de defensa frente a los patógenos.

Una vez que el patógeno llega al interior de la planta, éste la coloniza a través de los espacios intercelulares, pasando de una célula a otra. En este punto la planta ha activado sus mecanismos de defensa generando una serie de barreras físicas que impiden el avance del patógeno. Este tipo de defensa se basa en el engrosamiento de la pared celular por calosa y lignina, reforzando los posibles sitios de penetración y/o en lugares donde se encuentra el hongo (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Otro mecanismo es la producción de compuestos químicos como toxinas, compuestos con actividad antimicrobiana o especies reactivas de oxígeno (EROs)

(Hammond-Kosack & Jones, 1996; Lamb & Dixon, 1997). Las toxinas se sintetizan como consecuencia del metabolismo de la planta, o bien a través de reacciones dirigidas a su producción (Bednarek & Osbourn, 2009; Morrissey & Osbourn, 1999; Osbourn, 1996). Éstas se clasifican en fitoanticipinas, si se producen de forma constitutiva, como la  $\alpha$ -tomatina del tomate (Roddick, 1977) o como fitoalexinas, que se inducen en mayor cantidad cuando hay infección, como la pisatina del guisante (Matthews & Van Etten, 1983). Las plantas producen de forma constitutiva un gran número de compuestos antimicrobianos como son los fenólicos, glicosídicos, lactonas insaturadas, compuestos azufrados, saponinas, dienos, etc (Prusky & Keen, 1993).

La respuesta hipersensible (HR) es la más característica y efectiva de las defensas bioquímicas inducidas tras el reconocimiento del patógeno. Este mecanismo se basa en la rápida muerte programada de las células vegetales alrededor del foco de infección, formando áreas necróticas donde el patógeno queda confinado. Esta respuesta está asociada a un conjunto de modificaciones metabólicas que incluyen la generación de EROs y la activación transcripcional de sistemas de defensa. Como resultado, las células de la planta se mueren, se produce una acumulación local de fitoalexinas y se refuerza la pared celular gracias a la deposición en ella de calosa, lignina y suberina (Lamb & Dixon, 1997). Además, se producen proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) a nivel sistémico que se acumulan durante varios días y difunden por toda la planta, dando lugar a una resistencia sistémica adquirida (SAR) que le permite a la planta reaccionar rápidamente en infecciones posteriores ante la llegada del mismo u otro patógeno relacionado (Dixon & Lamb, 1990)

## **1.8. Interacción planta-patógeno**

La interacción planta-patógeno es un proceso complejo con varios estadios en los que actúan mecanismos de reconocimiento a distintos niveles. La combinación de todos ellos determina el éxito o fracaso de la infección (Callow, 1987). Los patógenos deben detectar la proximidad de la planta y poner en marcha su maquinaria de ataque y la adaptación al interior de la misma. Por su parte, la planta debe reconocer la presencia del patógeno y desarrollar una respuesta de defensa para detener la invasión del mismo. La detección del patógeno es, por tanto, el primer paso para que la planta responda activando su defensa y evitando así la infección.

En general, las especies vegetales no son hospedadoras 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 moléculas que pueden ser potencialmente detectadas por la planta, como es el caso de algunos polisacáridos o glicoproteínas presentes en las paredes fúngicas que advierten a la planta de la presencia del patógeno. Sin embargo, el patógeno puede desarrollar mecanismos para evitar ser reconocido como un agente extraño por parte de la planta. Por tanto, la planta se convertiría en hospedadora para ese patógeno en particular, dando lugar a una interacción compatible. En *F. oxysporum* la compatibilidad básica se establece a nivel de razas fisiológicas, avirulentas o virulentas, y cultivares, resistentes o sensibles. El concepto de virulencia, por tanto, se refiere al hecho de que una determinada raza fisiológica pueda provocar distintos grados de enfermedad sobre determinados cultivares.

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

La interacción entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y la planta de tomate cumple con el citado modelo "gen por gen". En esta *forma specialis* 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. La raza 2 es virulenta en la línea *I-1* y la raza 3 lo es en las líneas *I-1* e *I-2*. Sin embargo, la raza 1 no se define en relación al gen *I-2* y puede ser dividida en grupos en función de su virulencia sobre esta línea (Mes et al, 1999). Del mismo modo, las razas 1 y 2 no se definen en relación al gen *I-3* y entre los integrantes de estas razas pueden establecerse subgrupos en función de su virulencia en esta línea (Rep et al, 2005).

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

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

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

Recientemente se identificó en *F. oxysporum* otro gen de avirulencia denominado *avr1* (Houterman et al, 2008). El producto de este gen no solo actúa como factor de avirulencia en plantas *I-1*, sino que también suprime la resistencia mediada por efectores en plantas *I-2* e *I-3*. Así, cepas de *F. oxysporum* de las razas 2 y 3, por definición no patógenas en plantas *I-2* e *I-3* respectivamente, se vuelven patógenas al expresar *avr1* (Houterman et al, 2008). *Six3* codifica para otro gen de avirulencia (*avr2*) que confiere resistencia en plantas *I-2* (Silva et al, 2008).

### **1.9. Genes fúngicos esenciales para la patogénesis**

El creciente número de aislados patógenos resistentes a fungicidas representa una amenaza para la agricultura, la medicina y la veterinaria, obligando al desarrollo de nuevos principios activos. Sin embargo, debido a la frecuente resistencia cruzada, se requieren nuevas dianas para diseñar antifúngicos con nuevos modos de acción. La información obtenida a partir de la secuenciación de los genomas de hongos facilita la identificación de nuevos genes y proteínas útiles para el diseño de agentes con acción dirigida (Isaacson, 2002). La comprensión de las bases moleculares del proceso de infección puede contribuir al desarrollo de estrategias para el control de la enfermedad.

En *F. oxysporum*, al igual que en otros hongos patógenos, se han empleado dos tipos de aproximaciones para la identificación de genes esenciales en patogénesis. La estrategia denominada genética inversa consiste en la anulación dirigida de genes que codifican proteínas implicadas en funciones biológicas conocidas y presumiblemente relevantes para el proceso de infección (Di Pietro et al, 2003). Por otro lado, en la genética directa se buscan mutantes de patogenicidad obtenidos mediante inserción al azar de fragmentos de ADN, por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot et al, 1998), por integración de elementos genéticos móviles (Li Destri Nicosia et al, 2001; López-Berges et al, 2009) o por la integración de ADN

transformante mediada por enzimas de restricción (Imazaki et al, 2007; Namiki et al, 2001), y la posterior identificación del gen interrumpido (López-Berges et al, 2009; Madrid et al, 2003). No obstante, la anulación dirigida de genes ha sido el método que ha generado mayor información.

La tabla 2 resume los genes caracterizados en *F. oxysporum* que han resultado esenciales o están implicados de alguna manera en la patogénesis. Muchos de estos genes no son factores determinantes de patogenicidad, pero sí factores de virulencia, debido sobre todo a la redundancia genética y funcional existente en *F. oxysporum*.

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

Gen	Anotación	Virulencia en planta	Referencia
<i>abc3</i>	Transportador de varias drogas	reducida	(López-Berges et al, 2012)
<i>areA</i>	Factor de transcripción GATA; Activador del catabolismo del nitrógeno	reducida	(López-Berges et al, 2010)
<i>beas</i>	Beauvericina-eniatina sintasa	reducida	(Lopez-Berges et al, 2012)
<i>bmh2</i>	Proteína 14-3-3	reducida	(Miguel-Rojas & Hera, en preparación)
<i>chsV</i>	Quitin sintasa clase V	avirulento	(Madrid et al, 2003)
<i>chsVb</i>	Quitin sintasa clase VII	avirulento	(Martín-Urdíroz et al, 2008)
<i>chsV/chsVb</i>	Quitin sintasa clase V / Quitin sintasa clase VII	avirulento	(Martín-Urdíroz et al, 2008)
<i>chs2</i>	Quitin sintasa 2	reducida	(Martín-Urdíroz et al, 2008)
<i>chs7</i>	Chaperona de quitin sintasas	reducido	(Martín-Urdíroz et al, 2008)
<i>clc1</i>	Canal de cloro dependiente de voltaje	reducida	(Cañero & Roncero, 2008)
<i>con7</i>	Factor de transcripción	avirulento	(Pareja-Jaime, et al, en preparación)
<i>ctf1/ctf2</i>	Regulador de lipasas/Regulador de lipasas	reducida	(Bravo-Ruiz et al, 2013)
<i>fbp1</i>	Proteína F-box	reducida	Este trabajo
<i>fga1</i>	Subunidad a de proteína G	reducida	(Jain et al, 2002)
<i>fga2</i>	Subunidad a de proteína G	avirulento	(Jain et al, 2005)
<i>fgb1</i>	Subunidad b de proteínas G	reducida	(Delgado-Jarana et al, 2005)
<i>fhk1</i>	Histidina quinasa	reducida	(Rispaíl & Di Pietro, 2010)
<i>fmk1</i>	MAP quinasa	avirulento	(Di Pietro et al, 2001)
<i>fnr1</i>	Factor de transcripción	reducida	(Divon et al, 2006)
<i>frp1</i>	Proteína F-box	avirulento	(Duyvesteijn et al, 2005)
<i>gas1</i>	Beta-1,3-glucanosiltransferasa	avirulento	(Caracuel et al, 2005)
<i>gnt2</i>	N-acetilglucosamina transferasa	reducida	(López-Fernández et al, 2013)
<i>gtr1<sup>Q86L</sup></i>	GTPasa tipo Rag	reducida	(Navarro-Velasco, Tesis doctoral 2013)
<i>hapX</i>	Factor de transcripción bZIP; Regulador de la homeostasis del hierro	reducida	(Lopez-Berges et al, 2012)
<i>laeA</i>	Regulador de metabolitos secundarios	reducida	(Lopez-Berges et al, 2012)

Tabla 2. Continuación.

Gen	Anotación	Virulencia en planta	Referencia
<i>meaB</i>	Factor de transcripción bZIP; Represor del catabolismo del nitrógeno	reducida	(López-Berges et al, 2010)
<i>msb2</i>	Mucina transmembrana	reducida	(Perez-Nadales & Di Pietro, 2011)
<i>rho1</i>	GTPasa tipo Rho	avirulento	(Martínez-Rocha et al, 2008)
<i>rim15</i>	Proteína quinasa	reducida	(Navarro-Velasco, Tesis 2013)
<i>SCL7A5</i>	Transportador de aminoácidos	reducida	(Navarro-Velasco, Tesis 2013)
<i>SCL15A</i>	Transportador de aminoácidos	reducida	(Navarro-Velasco, Tesis 2013)
<i>snf1</i>	Proteína quinasa	reducida	(Ospina-Giraldo et al, 2003)
<i>sst2</i>	Regulador de proteínas G	reducida	(Michielse & Rep, 2009)
<i>ste12</i>	Factor de transcripción	reducida	(Rispaill & Di Pietro, 2009)
<i>tom1</i>	Tomatinasa 1	reducida	(Pareja-Jaime et al, 2008)
<i>tsc2</i>	Proteína activadora de GTPasa	reducida	(Navarro-Velasco, Tesis 2013)
<i>veA</i>	Proteína Velvet; respuesta a la luz, desarrollo y metabolismo secundario	reducida	(Lopez-Berges et al, 2012)
<i>velB</i>	Ortólogo de Velvet B	reducida	(López-Berges et al, 2012)

## 2. Modificaciones proteicas señalizadoras: ubiquitinación y fosforilación como reguladores moleculares

### 2.1. Ubiquitinación y degradación proteica

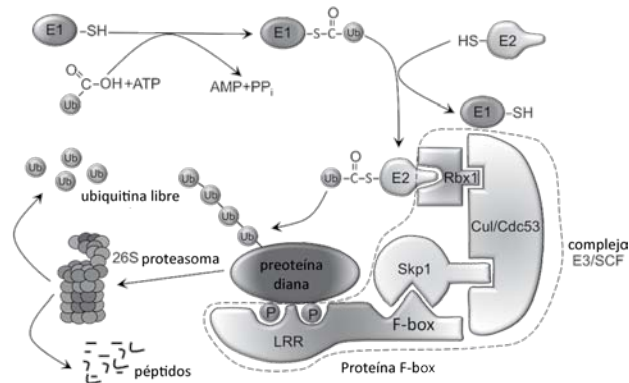
El recambio proteico es un mecanismo muy importante para la regulación de las funciones celulares en eucariotas. Durante la proteólisis, las proteínas son hidrolizadas hasta aminoácidos y éstos son usados para la síntesis de nuevas proteínas. La proteólisis es un proceso altamente específico en el que están implicadas un grupo diverso de enzimas llamadas proteasas. En los organismos eucariotas, existen dos vías principales para la degradación de proteínas: la proteólisis lisosomal y el sistema del proteasoma-ubiquitina (Lecker et al, 2006).

Algunas proteínas citosólicas son degradadas por los lisosomas tras ser envueltas por vacuolas autofágicas que se fusionan con lisosomas, proceso que se ve acelerado en hambre de carbono y nitrógeno (Baehrecke, 2005). Las proteínas que son susceptibles de ser degradadas por esta vía son aquellas que tienen una vida media larga pero que no son indispensables. Sin embargo, la mayoría de las proteínas intracelulares son degradadas por la vía del proteasoma-ubiquitina, el cual es un

sistema que degrada proteínas con un alto grado de especificidad (Glickman & Ciechanover, 2002; Lecker et al, 2006).

La vía de degradación de proteínas intracelulares a través del proteasoma-ubiquitina hace uso de moléculas de ubiquitina para marcar las proteínas diana para su rápida proteólisis. La ubiquitina es una proteína reguladora de 76 aminoácidos que se encuentra altamente conservada en eucariotas. Las proteínas se marcan por la adición de múltiples moléculas de ubiquitina para posteriormente ser reconocidas y degradadas a pequeños péptidos por el proteasoma 26S, un gran complejo multicatalítico con función proteasa que libera las moléculas de ubiquitina para ser reutilizadas (Glickman & Ciechanover, 2002). Tres componentes enzimáticos son necesarios para ensamblar las cadenas de ubiquitina en los sustratos que son destinados a su destrucción proteolítica. Primero, la ubiquitina es activada por la enzima E1 (enzima activadora de ubiquitina) a través de una reacción que requiere ATP como fuente de energía y en la que se forma un enlace tioéster entre el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo sulfhidrilo o tiol (-SH) de la cisteína de E1. La ubiquitina ahora es transferida a una enzima conjugadora de ubiquitinas E2 a través de una reacción de tioesterificación. En el paso final de la cascada de ubiquitinación, una proteína ligasa E3 de ubiquitinas (a menudo llamada simplemente ligasa de ubiquitina) cataliza la transferencia de la ubiquitina a un sustrato específico mediante la creación de un enlace isopeptídico entre una lisina de la proteína diana y la glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina (figura 4). Las lisinas de las ubiquitinas ya conjugadas al sustrato pueden ser la diana para la adición de nuevas moléculas de ubiquitina mediante la formación de un nuevo enlace isopeptídico (Ciechanover & Iwai, 2004; Pickart, 2001; Weissman, 2001). Este residuo de lisina a través del cual se produce la poliubiquitinación es muy importante. Por ejemplo, la formación de cadenas de ubiquitina a través de las lisinas, Lys-48 y Lys-29, pueden actuar como señal para que los sustratos poliubiquitinados sean reconocidos y degradados por el proteasoma 26S (Hershko & Ciechanover, 1998; Spruck & Strohmaier, 2002); sin embargo, la adición de ubiquitinas en otros residuos de lisina, como la Lys-63, podría actuar como señal para la reparación de ADN, activación de factores de transcripción, etc. (Weissman, 2001). Por otro lado, la monoubiquitinación de proteínas tiene otras funciones como la endocitosis, la regulación de histonas, regulación de factores de transcripción, etc. (Hicke, 2001; Silva et al, 2008).

Las enzimas E3 funcionan como los centros de reconocimiento del sustrato del sistema y son capaces de interactuar tanto con E2 como con el sustrato.



**Figura 4. Complejo SCF y ubiquitinación de proteínas.** La ubiquitina es conjugada al sustrato gracias a la acción de tres enzimas en procesos dependientes de ATP. La formación de cadenas con varias ubiquitinas sobre el sustrato normalmente supone su degradación por proteólisis en el proteasoma 26S. Ver texto para más detalle del esquema. Adaptado de (Liu & Xue, 2011).

La importancia del sistema del proteasoma-ubiquitina en eucariotas superiores ha sido reconocida recientemente tras descubrir que las proteínas F-box son receptores de varias hormonas vegetales importantes (Mockaitis & Estelle, 2008) y que mutaciones en la vía de la ligasa de ubiquitina E3 dan lugar a enfermedades humanas (Sakamoto, 2002). El potencial terapéutico del sistema del proteasoma-ubiquitina ha sido activamente evaluado de forma que se han desarrollado drogas que actúan como inhibidores del proteasoma para tratar diversas enfermedades (Mitsiades et al, 2005).

## 2.2. Ligasas de ubiquitina: Complejo SCF

Las enzimas clave en el proceso de ubiquitinación son las ligasas de ubiquitina E3 puesto que son las que actúan como moduladores para el reconocimiento del sustrato y además son las que transfieren la ubiquitina activada a dicho sustrato. Determinadas ligasas de ubiquitina son responsables de la degradación selectiva de proteínas puesto que son capaces de unir sustratos específicos que contienen señales de reconocimiento bien definidas (Hershko & Ciechanover, 1998).

Generalmente, las ligasas de ubiquitina E3 se dividen en dos clases estructurales muy amplias: la familia con el dominio HECT (*homologous to E6-Ap C-terminus*), donde el dominio HECT formado por una ligasa E3 monomérica acepta la ubiquitina de la E2 y



la transfiere al sustrato (Bernassola et al, 2008), y la familia con el dominio RING (*really interesting new gene*)(Jackson et al, 2000).

Las proteínas Skp1 (*suppressor of kinetochore protein mutant*), Cul1 (*cullin*) y la proteína F-box (SCF) son el grupo de ligasas E3 mejor conocido de entre las ligasas RING. Tres grandes componentes del complejo SCF, Spk1, Cul1 y Rbx1 (*ring-box protein*), constituyen el núcleo invariable que se asocia con una proteína F-box determinada la cual une los sustratos específicos (figura 4). En asociación con las enzimas E1 y E2, el complejo SCF puede transferir ubiquitinas a la proteína diana (Connelly & Hieter, 1996; Kamura et al, 1999; Patton et al, 1998).

El complejo de ligasa E3 SCF fue identificado por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde funciona catalizando la ubiquitinación, dependiente de fosforilación, de las ciclinas de G1 y los inhibidores de las CDK (Bai et al, 1996; Feldman et al, 1997; Skowyra et al, 1997). Además juega un papel muy importante en la regulación de factores de transcripción (Kaiser et al, 2000) y reguladores implicados en las fases G2 y M del ciclo celular (Bastians et al, 1999; Michael & Newport, 1998), así como en el marcaje de otras proteínas celulares para su degradación.

### **2.3. Proteínas F-box**

Las proteínas F-box son proteínas que contienen un dominio F-box, un motivo estructural de aproximadamente 50 aminoácidos inicialmente identificado en la ciclina F en humanos (D'Angiolella et al, 2013). Estas proteínas generalmente interactúan con Spk1 en los complejos ligasa E3 o SCF participando en la ubiquitinación y degradación de las proteínas. Son las responsables de la especificidad de sustrato en los complejos SCF ya que interactúan con las proteínas diana a través de sus dominios de unión a proteína localizados en el extremo C-terminal, donde se incluyen las repeticiones ricas en leucina (LRR), repeticiones WD40, dedos de zinc y dominios ricos en prolina (Cardozo & Pagano, 2004; Kipreos & Pagano, 2000). Por tanto, se encargan de reclutar el sustrato al núcleo del complejo SCF a través de la interacción entre el dominio F-box y la proteína Skp1 (Bai et al, 1996). Sin embargo, para que las proteínas F-box reconozcan a sus sustratos es necesario que éstos previamente se encuentren fosforilados.

Existe un gran número de proteínas F-box en todos los organismos eucariotas estudiados hasta ahora, y muy probablemente cada una de ellas se una a múltiples

sustratos para su ubiquitinación. Las proteínas F-box en hongos son muy importantes en la regulación de varios procesos celulares como el ciclo celular, el reloj circadiano, la transcripción, el desarrollo, la transducción de señales y la percepción de nutrientes (Jonkers & Rep, 2009). Se han realizado numerosos estudios en las dos levaduras modelo *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* para comprender mejor el funcionamiento de las ligasas E3 SCF. *S. cerevisiae* contiene al menos 20 proteínas con dominio F-box y muchas de ellas han sido estudiadas en profundidad como la proteína resistente a la represión por glucosa 1 (GRR1) (Jonkers & Rep, 2009). GRR1 forma parte del complejo ligasa E3 SCF<sup>GRR1</sup> e interacciona con Skp1 a través de su dominio F-box y con sus sustratos a través del dominio LRR. Se identificó inicialmente como un elemento responsable de la represión por glucosa (Flick & Johnston, 1991) pero también participa en la regulación del ciclo celular (Li et al, 2006; McCourt et al, 2013) y en el control de la percepción de nutrientes (Spielewoy et al, 2010).

A pesar de la gran cantidad de estudios que existen en los organismos modelo, como *S. cerevisiae*, se conoce muy poco de las ligasas E3 SCF en otros hongos. Puesto que la vía del proteasoma-ubiquitina se usa como diana terapéutica en enfermedades humanas (Mitsiades et al, 2005), resultaría interesante entender las bases moleculares que rigen esta vía en hongos patógenos para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

#### **2.4. Proteínas F-box en patógenos fúngicos**

La implicación de las proteínas F-box en patógenos ha sido estudiada tanto en hongos patógenos humanos (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*) como en patógenos de plantas (especies de *Fusarium* y *Magnaporthe oryzae*). La mayor parte de estas investigaciones se han centrado en buscar homólogos a GRR1 de *S. cerevisiae*, demostrándose que estas proteínas F-box son importantes para la patogenicidad del hongo (Liu & Xue, 2011).

En *C. neoformans* se ha identificado Fbp1 como una proteína F-box que presenta similitud con GRR1 de *S. cerevisiae* e interacciona físicamente con homólogos de Skp1, sugiriendo que puede formar parte de la ligasa de ubiquitina E3 SCF (Liu et al, 2011).

Tanto GRR1 como CDC4 son requeridas para la transición morfológica entre levadura y forma hifal que sufre *C. albicans*, la cual es un importante factor de invasión

del hospedador y establecimiento de la enfermedad (Atir-Lande et al, 2005; Butler et al, 2006; Shieh et al, 2005). Sin embargo, aunque la degradación de proteínas mediada por la ubiquitinación está implicada en el cambio dimórfico de *C. albicans*, no se ha establecido un papel directo entre estas proteínas y la virulencia.

En hongos filamentosos, como es el caso de las distintas especies de *Fusarium* existen un mayor número de proteínas F-box que en levaduras: entre 60-94 en *Fusarium* en comparación con unas 20 en levaduras. Esto sugiere que las proteínas F-box contribuyen a la regulación de procesos metabólicos y del desarrollo complejos. En *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* y *M. oryzae*, todos ellos patógenos de plantas y responsables de grandes pérdidas económicas en cultivos de interés, se han identificado proteínas F-box implicadas tanto en patogénesis como en múltiples funciones celulares (Duyvesteijn et al, 2005; Han et al, 2007; Miguel-Rojas & Hera, 2013; Sweigard et al, 1998).

## 2.5. Fosforilación y cascadas de transducción de señales

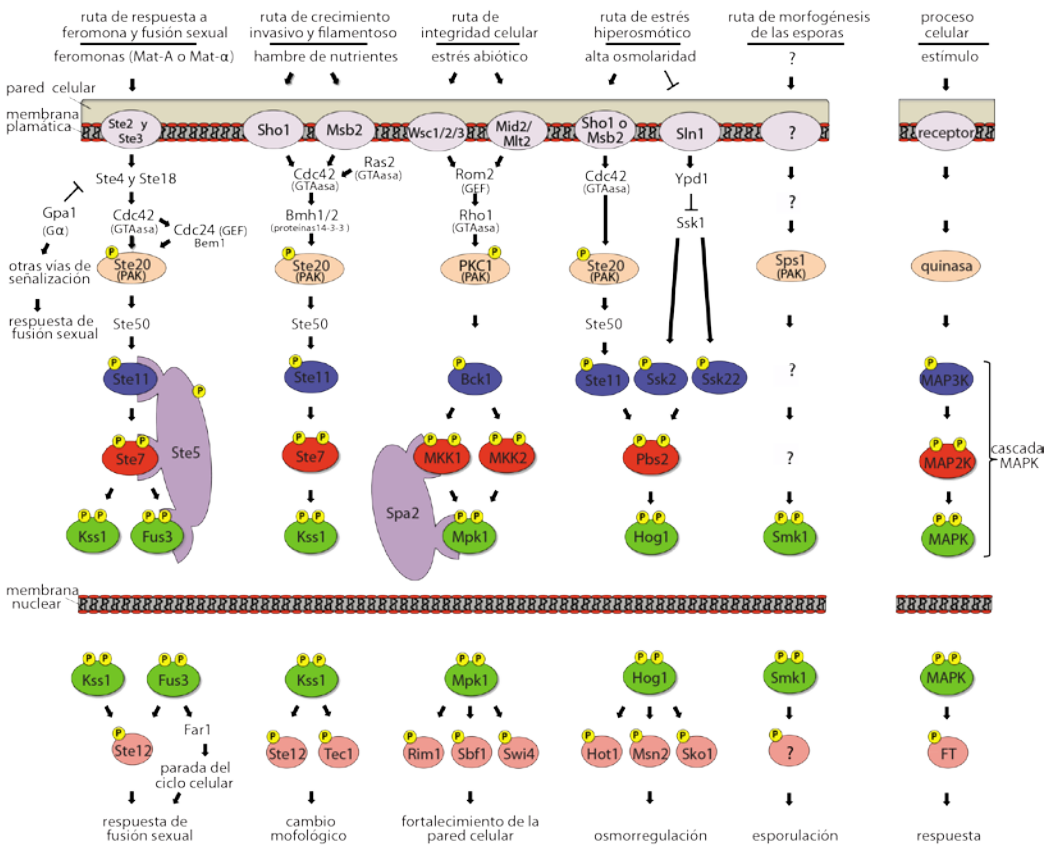
Los hongos son capaces de sentir y responder a cambios en el medio ambiente. Las vías de transducción de señales juegan un papel muy importante en la percepción de estos cambios y la posterior activación de la maquinaria intracelular para adaptar la respuesta celular. Normalmente, la transducción de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

En eucariotas, una familia de serina/treonina proteínas quinasas conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) funcionan en la transducción de una gran cantidad de señales extracelulares y en la regulación del desarrollo de varios procesos (Widmann et al, 1999). La vía MAP quinasa está constituida por un módulo muy conservado de tres quinasas: la MAP quinasa (MAPK), la MAP MAP quinasa (MAPKK) y la MAP MAP MAP quinasa (MAPKKK o MEK) que secuencialmente se activan las unas a las otras por fosforilación (figura 5). Las señales aguas arriba de estas vías son detectadas por receptores específicos desencadenando con ello la transducción de la señal bien de forma directa a través del módulo central o bien a través de componentes intermediarios de la señalización. Las MAPK quinasas, que están altamente conservadas a lo largo de la evolución, fosforilan un grupo de sustratos muy amplio de entre los cuales se encuentran factores de transcripción, reguladores de la traducción, proteínas quinasas activadas por MAPK, fosfatasas y otras clases de proteínas implicadas en regulación del metabolismo, morfología celular, progresión del ciclo celular y expresión génica en respuesta a una gran variedad de estreses extracelulares (Qi & Elion, 2005).

### 2.5.1. Rutas MAP quinasas en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, las cascadas MAPK constituyen una vía de señalización esencial implicadas en aspectos clave del ciclo de vida de la levadura (Chen & Thorner, 2007). Estos grandes módulos proteicos así como sus reguladores aguas arriba y sus sustratos aguas abajo están altamente conservados incluso en sus parientes lejanos los hongos, incluyendo patógenos de plantas (Rispaill et al, 2009).

Cuatro rutas MAP quinasa regulan el crecimiento celular y la morfogénesis en respuesta a diferentes estímulos medioambientales en levaduras (figura 5): Fus3 que controla la respuesta a feromonas de apareamiento sexual, Kss1 que regula el crecimiento invasivo y filamentoso, Mpk1/Stl2 que controla el remodelado de la superficie celular en respuesta a estrés hiposmótico y Hog1 que es requerido para la adaptación a estrés hiperosmótico (Chen & Thorner, 2007). Una quinta ruta MAP quinasa, Smk1 regula específicamente la esporulación (Gustin et al, 1998). Es una ruta singular porque sólo se expresa en las últimas etapas de la meiosis (Krisak et al, 1994) y pierde las quinamas MEK y MEKK. No presenta homología en otros hongos, excepto para algunos ascomicetos como *Ashbye gossypii* y *Kluyveromyces lactis* (Zhao et al, 2007). Algunas revisiones recientes proporcionan una visión muy amplia a cerca de estas rutas de señalización en levaduras desde las señales que las desencadenan hasta las dianas transcripcionales (Chen & Thorner, 2007; Hamel et al, 2012).



**Figura 5. Rutas MAPK en *Saccharomyces cerevisiae*.** (Ver texto para más detalle de cada una de las rutas de señalización). Adaptado de (Hamel et al, 2012).

### 2.5.2. Rutas MAP quinasa en hongos patógenos

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

Tras la caracterización de la primera ruta MAPK en el hongo patógeno del arroz *M. grisea* (Xu & Hamer, 1996), muchas otras rutas MAPK se han identificado a lo largo de la última década tanto en patógenos de plantas como de humanos, demostrándose que regulan la infección a través de la morfogénesis y la virulencia (Zhao et al, 2007). En muchos casos, las rutas MAPK conservan una organización, estructura y función similares, sin embargo, existen diferencias muy importantes que reflejan la especialización de estas vías y la influencia de su papel en virulencia.

La genómica comparativa ha facilitado el estudio de las vías de señalización en hongos (Rispaill et al, 2009) y completas cascadas de señalización MAPK han sido bien definidas en hongos patógenos de plantas. Una reciente y completa revisión de todas las rutas MAPK conocidas hasta la fecha en hongos patógenos la encontramos en Hamel (2012).

### 3. Proteínas 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia de proteínas ácidas, diméricas y altamente conservadas. Cada subunidad presenta una masa aproximada de 30 kDa. Su nombre procede de una clasificación sistemática que se realizó de las proteínas de cerebro en 1967. Los números del nombre proceden del número de la fracción en la que se obtuvieron tras una cromatografía de intercambio iónico y la posterior posición en un gel de electroforesis (Moore & Perez, 1967).

Inicialmente fueron identificadas como proteínas específicas del cerebro pero más tarde se encontró que estaban presentes en todos los tejidos y organismos eucariotas estudiados. Muchos contienen múltiples isoformas, por ejemplo en mamíferos se han identificado siete más sus correspondientes versiones fosforiladas, mientras que la planta modelo *Arabidopsis thaliana* contiene al menos 13 isoformas. Las levaduras *S. cerevisiae* y *Sz. pombe* (Ford et al, 1994; Heusden et al, 1995; van Heusden et al, 1992) contienen únicamente dos isoformas cada una, mientras que la levadura patógena *C. albicans* solo tiene una.

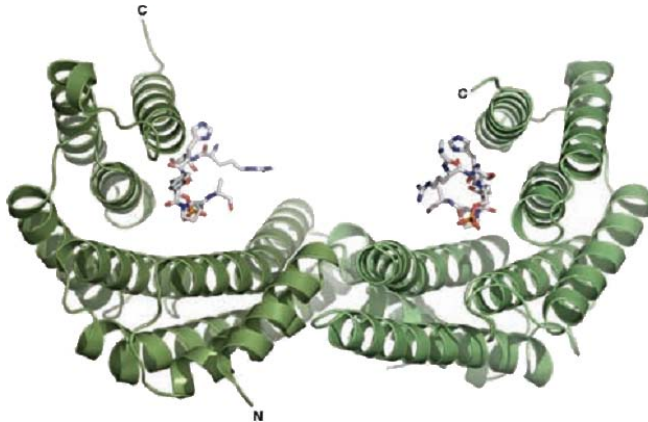
Los alineamientos de las proteínas 14-3-3 de distintos organismos, desde levaduras a humanos, demuestran que son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución aunque el extremo carboxi terminal es bastante variable (van Heusden & Steensma, 2006).

Son proteínas capaces de unirse a numerosos sustratos y hasta la fecha se han identificado aproximadamente 200 en diversos organismos eucariotas como humanos, levaduras y plantas (Tinti et al, 2014; van Heusden, 2009) . Estos ligandos están implicados en casi todos los procesos celulares y en la mayoría de los casos se encuentran fosforilados cuando se unen a las proteínas 14-3-3. La versatilidad de unión a diferentes sustratos hace que estas proteínas estén relacionadas con muchas enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, la ataxia espinocerebelosa tipo 1 y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) (Li et al, 2013; Qureshi et al, 2013).

#### 3.1. Estructura y dimerización

Las proteínas 14-3-3 son por naturaleza proteínas diméricas que pueden formar homo- o heterodímeros con las demás isoformas (Jones et al, 1995). Estudios estructurales confirman su naturaleza dimérica y además revelan que cada monómero

está constituido por 9  $\alpha$ -hélices antiparalelas (figura 6) (Liu et al, 1995; Xiao et al, 1995). El dímero, con forma de U, presenta en el centro un canal bastante profundo con dos surcos anfipáticos capaces de unir dos péptidos del ligando. Los residuos del interior del canal están altamente conservados entre las diferentes isoformas, mientras que los residuos más variables constituyen la superficie externa de la proteína.



**Figura 6. Estructura cristalina de la isoforma 14-3-3 $\zeta$  de humanos.** Visión ortogonal del dímero unido a un fosfopéptido (representado por palitos). Imagen tomada de (Obšilová et al, 2008)

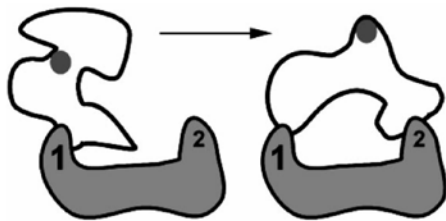
Todas ellas comparten una estructura muy similar constituida por un dominio de dimerización localizado en el extremo amino terminal y un dominio de unión a ligando. Estudios de cristalografía han demostrado que el dominio de unión al ligando abarca residuos desde el extremo amino- al extremo carboxi- terminal de la proteína, mientras que el dominio de dimerización supone la interconexión de varias regiones localizadas en el extremo amino- terminal (Ichimura et al, 1995; Liu et al, 1995; Luo et al, 1995; Wang et al, 1998; Xiao et al, 1995; Zhang et al, 1997).

Análisis en detalle de las interacciones de las proteínas 14-3-3 con sus correspondientes ligandos han identificado dos motivos de unión óptimos, RSXpSXP y RX(Y/F)XpSXP (X indica cualquier aminoácido salvo la cisteína), que son reconocidos por todas las isoformas (Muslin et al, 1996; Rittinger et al, 1999; Yaffe et al, 1997). En estas secuencias consenso pS se refiere tanto a fosfoserinas como fosfotreoninas. Sin embargo, aunque la mayor parte de los ligandos contengan uno de estos dos motivos de unión, varias proteínas contienen otros dominios como: YpTV (Fuglsang et al, 1999), KGQSTpSRG (Waterman et al, 1998) e incluso dominios de unión no fosforilados, GHSL (Andrews et al, 1998; Du et al, 1996).



Existen investigaciones confrontadas acerca de si la dimerización de estas proteínas afecta o no a su unión al ligando (Ichimura et al, 1997; Ichimura et al, 1995; Luo et al, 1995; Tzivion et al, 2000; Tzivion et al, 1998). Yaffe *et al.* (1997) demuestran que polipéptidos sintéticos que tienen dos sitios de unión a proteínas 14-3-3 incrementan su afinidad de unión en más de 30 veces. De este modo, proteínas que tienen dos sitios de unión de baja afinidad (dominios de unión no óptimos) se unirán a proteínas 14-3-3 diméricas pero no en su estado monomérico, mientras que proteínas que tienen un único dominio de unión (dominio de unión óptimo) se unirán también a las formas monoméricas. Así, se ha demostrado que muchas proteínas diana de las 14-3-3s, como por ejemplo Wee1 (Honda et al, 1997), que no contienen los motivos de unión óptimos, requieren la presencia de más de un sitio de fosforilación para poder unirse a las proteínas 14-3-3.

Basándose en todas estas observaciones Yaffe (2002) ha propuesto un modelo de interacción 14-3-3/ligando (figura 7). El modelo sugiere que la unión inicialmente depende de la interacción de un motivo dominante con una subunidad monomérica 14-3-3 (1). A continuación, se produce la unión de uno o más sitios secundarios (débiles) a la segunda subunidad 14-3-3 (2) facilitando de este modo la conformación del ligando (por ejemplo, el ligando expone una o más regiones que eran inaccesibles en estado libre o unido a una forma monomérica). Si el dominio dominante estuviese ausente o no fosforilado, el segundo dominio de unión sería demasiado débil como para promover una interacción estable entre el ligando y la proteína 14-3-3.



**Figura 7. Modelo de unión ligando-proteína 14-3-3.** El círculo negro representa una región del ligando que queda expuesta tras unirse a la proteína 14-3-3. Imagen tomada de (Yaffe, 2002).

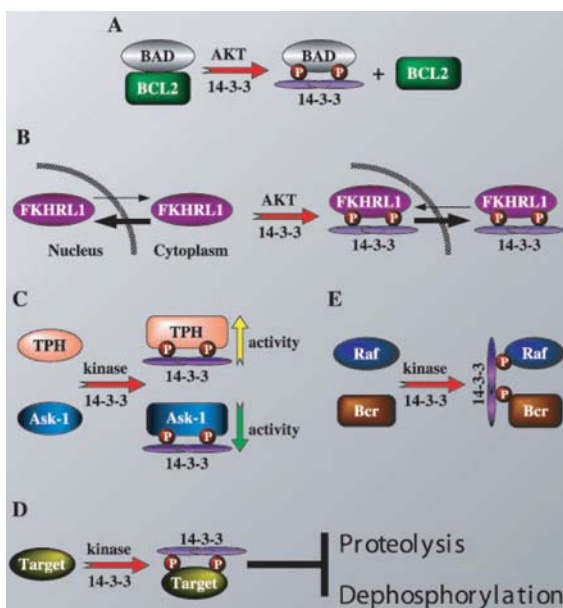
Por tanto, el papel de la dimerización se extiende más de allá de la simple unión entre ligando-proteína, y pasa a tener un profundo papel en la regulación de la función de la proteína diana. El ejemplo más claro de este concepto se ha demostrado en el caso de la regulación de Raf, donde sólo su unión a una forma dimérica de las 14-3-3s le proporciona su actividad quinasas (Tzivion et al, 2000; Tzivion et al, 1998).

### 3.2. Modelos de acción

Las proteínas 14-3-3 son capaces de interactuar con una gran cantidad de ligandos interfiriendo en múltiples funciones celulares. Sin embargo, todas estas funciones derivan de su capacidad específica para unirse a residuos de fosfoserinas y fosfotreoninas de sus proteínas diana. Por tanto, la variabilidad de las funciones no es una propiedad intrínseca de las proteínas 14-3-3, sino que es un reflejo de la proteína diana.

Las distintas funciones de las proteínas 14-3-3 pueden agruparse en cinco modos de acción principales (figura 8), todos ellos como consecuencia de la unión de la proteína 14-3-3 a la proteína diana:

**(A)** Alterar la capacidad de la proteína diana para interactuar con otras proteínas. Un ejemplo muy bien estudiado es el de BAD (Datta et al, 2000). La quinasa AKT cataliza la fosforilación de BAD lo cual supone su unión a la proteína 14-3-3, interfiriendo en su unión con el inhibidor Bcl2. El resultado de esta unión es una inhibición de la apoptosis.



**Figura 8. Ejemplos de los modelos de acción de las proteínas 14-3-3.** (Para más detalles ver el texto). Figura tomada de (Tzivion & Avruch, 2002).

**(B)** Modificar la localización de la proteína diana (Muslin & Xing, 2000). Esta función se lleva a cabo a través de dos mecanismos: I. las proteínas 14-3-3 pueden facilitar el transporte nuclear de su proteína diana a través de su propia secuencia de transporte nuclear localizada en el extremo carboxilo terminal (Lopez-Girona et al, 1999).

II. las proteínas 14-3-3 pueden enmascarar señales de importe nuclear de sus proteínas diana, reduciendo así el ratio de importe nuclear de éstas (Yang et al, 1999). Ambos mecanismos en conjunto generan la exclusión del núcleo y la retención en el citoplasma de las proteínas diana.

(C) Alterar la actividad catalítica intrínseca de su proteína diana, inhibiendo o aumentando su función.

(D) Proteger a la proteína diana de otras modificaciones como defosforilaciones o proteólisis.

(E) Servir de puente de unión entre dos proteínas, actuando como una proteína de andamiaje dependiente de fosforilación. Esta función ha sido demostrada para la interacción entre Raf-Bcr (Brasemann & McCormick, 1995).

### 3.3. Proteínas 14-3-3 en levaduras

Para describir genes que interaccionan genética y/o físicamente con las BMH de *S. cerevisiae* se han desarrollado numerosas aproximaciones genéticas y proteómicas (van Heusden, 2009; van Heusden & Steensma, 2006). Debido al gran número de genes descritos hasta la fecha se puede afirmar que son proteínas implicadas en multitud de procesos celulares y por tanto, las redes en las que participan estas proteínas son muy complejas. Por ejemplo, participan en la morfología celular, concretamente en citoquinesis (Heusden et al, 1995), son requeridas para el desarrollo pseudohifal (Roberts et al, 1997), están implicadas en crecimiento y diferentes tipos de estrés (Wang et al, 2009); están implicadas también en el crecimiento filamentoso (Cognetti et al, 2002) el cual es esencial para la patogenicidad de *C. albicans*. Otro ejemplo sería su participación en la respuesta al daño en el ADN en *Sz. pombe* (Ford et al, 1994).

También se están llevando a cabo estudios para conocer cuáles son las quinasas implicadas en la fosforilación de los ligandos de las proteínas 14-3-3 (van Heusden, 2009).

### 3.4. Regulación de la actividad

Aunque las proteínas 14-3-3 regulan multitud de procesos celulares, su propia actividad también se encuentra regulada y ocurre a múltiples niveles. Primero, la transcripción de los genes que codifican las proteínas 14-3-3 no es constante. Por

ejemplo, la expresión de los genes *BMH* en *S. cerevisiae* está alterada, incrementada o reducida, tras la exposición a diferentes tipos de estreses como choque térmico, fase estacionaria prolongada, ditiotreitól (DTT) (Gasch et al, 2000; Wang et al, 2009). Por tanto, las regiones promotoras de los genes que codifican las proteínas 14-3-3 juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de las diferentes isoformas. Segundo, la proteína Bmh2 de *S. cerevisiae* puede ser ubiquitinada (Peng et al, 2003), sugiriéndose así una regulación por degradación proteolítica. En eucariotas superiores la actividad de las proteínas 14-3-3, además, se encuentra regulada por fosforilación, dimerización (Powell et al, 2003; Woodcock et al, 2003), cAMP (Camoni et al, 2001) y probablemente por  $\text{Ca}^{+2}$  (Lu et al, 1994). Sin embargo, aún no existen evidencias de este tipo de regulaciones en levaduras.

La interacción entre las proteínas 14-3-3 y sus proteínas diana también puede estar regulada por la presencia de pequeños ligandos. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el de la fusicoccina, un terpenoide secretado por el ascomiceto patógeno de plantas *Fusicoccum amygdali*. La fusicoccina mejora la unión de la proteína 14-3-3 a la ATPase- $\text{H}^{+}$  de la membrana plasmática de la planta gracias a que estabiliza la interacción entre ambas (Würtele et al, 2003).



**Objetivos**



El objetivo general de esta tesis ha sido identificar las proteínas diana del sistema de degradación del proteasoma-ubiquitina SCF<sup>Fbp1</sup> en el hongo patógeno del tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, a través del estudio de Fbp1, una proteína F-box que forma parte de este sistema.

Para analizar el papel de Fbp1 se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Inactivación dirigida de *fbp1* y caracterización fenotípica y patotípica del mutante
2. Análisis e identificación de proteínas intracelulares diferencialmente expresadas en el mutante  $\Delta fbp1$  en condiciones de crecimiento invasivo.
3. Obtención de mutantes nulos de proteínas sobre-expresadas en el mutante  $\Delta fbp1$  para su caracterización fenotípica.





## **Materiales y métodos**



# 1. Materiales

## 1.1. Material biológico

### 1.1.1. Bacterias

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Cepas bacterianas**

Especie	Cepa	Genotipo
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 <i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15) <i>hsdR17, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>. Receptora en experimentos de transformación genética para amplificación de plásmidos, PCR y secuenciación de ADN.</i>
	XL1-Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' <i>proAB lacI<sup>\beta</sup></i><math>\Delta</math>M15 <i>Tn10</i> (Tet<sup>r</sup>)]</i> . Receptora en experimentos de transformación genética para amplificación de plásmidos, PCR y secuenciación de ADN.

### 1.1.2. Hongos

Las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Cepas fúngicas**

Cepa	Genotipo	Fuente/Referencia
4287	Estirpe silvestre (raza 2)	(Dr. J. Tello <sup>1</sup> )
$\Delta$ <i>fbp1</i>	<i>fbp1::HYG</i>	(Miguel-Rojas & Hera, 2013), este trabajo
$\Delta$ <i>fbp1+ fbp1</i>	<i>fbp1::HYG; fbp1</i> , PHLEO	(Miguel-Rojas & Hera, 2013), este trabajo
Nit1 <sup>-</sup>	<i>Nit1</i>	(Prados Rosales & Di Pietro, 2008)
NitM <sup>-</sup>	<i>nitM</i>	(Prados Rosales & Di Pietro, 2008)
$\Delta$ <i>fbp1 nit</i>	<i>fbp1::HYG; nit1</i>	Presente trabajo
$\Delta$ <i>fbp1 niM</i>	<i>fbp1::HYG; nitM</i>	Presente trabajo
$\Delta$ <i>bmh2</i>	<i>bmh2::HYG</i>	Presente trabajo
$\Delta$ <i>bmh2+bmh2</i>	<i>bmh2::HYG; bmh2</i> , PHLEO	Presente trabajo
$\Delta$ <i>bmh1</i>	<i>bmh1::HYG</i>	Presente trabajo
<i>bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub>	<i>bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub> ::PHLEO	Presente trabajo
<i>bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub> <sup>+</sup> <i>bmh2</i>	<i>bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub> ::PHLEO; <i>bmh2</i> , HYG	Presente trabajo
$\Delta$ <i>fbp1 bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub>	<i>fbp1::HYG; bmh2</i> $\Delta$ <sub>210-266</sub> ::PHLEO	Presente trabajo

<sup>1</sup>Dpto. Producción vegetal, Universidad de Almería.

### 1.1.3. Plantas

Los cultivares utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Cultivares usados en el presente estudio**

Cepa	Cultivar	Características
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Daniela (fruto)	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	Monika (semillas) <sup>1</sup>	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	Money Maker (semillas) <sup>1</sup>	Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

<sup>1</sup>cedidas por Syngenta Seeds, (Almería).

## 1.2. Vectores de clonación

Los vectores de clonación usados se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Vectores de clonación**

Plásmido	Características	Fuente/Referencia
pGem <sup>®</sup> -T	Derivado de pGem <sup>®</sup> -5Zf (+), linearizado con la enzima <i>EcoRV</i> y con una Timina en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con Adenina en sus extremos. Confiere resistencia a ampicilina	Promega
pAN7-1	Portador del gen <i>hph</i> bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i>	(Punt et al, 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 pUC18EcoRI-SalI	(Mattern et al, 1988)
pSpark <sup>®</sup> I	Linearizado con <i>EcoRV</i> , permite la clonación de fragmentos de PCR con extremos romos. Confiere resistencia a ampicilina	Canvax, Biotech

## 1.3. Medios de cultivo

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

### 1.3.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

- **Medio Luria-Bertani:**

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

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

- **Medio X-GAL (LB+IPTG+X-GAL):** Medio LA suplementado con 134  $\mu$ M de isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG), 0,005% (p/v) X-Gal (disuelto en formamida) y 0,005% ampicilina (p/v).

### 1.3.2. Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*

- **Medio nutritivo:**

**PDB (Potato Dextrose Broth; líquido):** 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.

**PDA (Potato Dextrose Agar):** 3,9% (p/v) de un compuesto constituido por agar, patata, peptona y glucosa (*Scharlau Microbiology*).

Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20  $\mu$ g/mL en PDB o 55  $\mu$ g/mL en PDA) o fleomicina (2,4  $\mu$ g/mL en PDB o 6  $\mu$ g/mL en PDA). El pH del medio se ajustó a 8 con NaOH 10N cuando contenía fleomicina.

- **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 Puhalla (Puhalla, 1968):**  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/L);  $KH_2PO_4$  (1 g/L); KCl (0,5 g/L);  $NaNO_3$  (2 g/L) y sacarosa (30 g/L). Añadir 15 g/L de agar oxid para medio sólido.

Este mismo medio fue utilizado sustituyendo el  $NaNO_3$  por  $NH_4NO_3$  en función del experimento.

- **Medio mínimo de regeneración:**  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/L);  $KH_2PO_4$  (1 g/L); KCl (0,5 g/L);  $NaNO_3$  (2 g/L); glucosa (20 g/L); sacarosa (200 g/L) y agar oxoid (12,5 g/L para las placas y 4 g/L para la cobertera). Para seleccionar resistentes a fleomicina fue necesario ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N después de la esterilización.
- **Medio con ácido poligalacturónico (PGA) pH 6,5:** poligalacturonato sódico (5 g/L); sacarosa (2 g/L);  $(NH_4)_2SO_4$  (2 g/L) y agar oxoid (15 g/L). Se esterilizó el poligalacturonato sódico, junto con la sacarosa y la fuente de nitrógeno. El agar se autoclavó por separado. Una vez esterilizado y atemperado, al medio se le añadió el tampón fosfato potásico<sup>(1)</sup> pH 6,5 a una concentración final de 25 mM.

<sup>(1)</sup> **Tampón fosfato potásico:** Preparar 1 M  $KH_2PO_4$  y 1 M  $K_2HPO_4$  y esterilizar en autoclave. Mezclar 68,5 mL de la sal monopotásica con 31,5 mL de la sal dipotásica.

- **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 minutos en la campana de flujo laminar vertical.

Este mismo medio se utilizó sustituyendo la sacarosa por distintas fuentes de carbono o sustituyendo el  $NaNO_3$  por distintas fuentes de nitrógeno en función del experimento.

#### 1.4. Compuestos químicos, enzimas, anticuerpos y kits comerciales

Los compuestos químicos, enzimas, anticuerpos y kits comerciales usados durante este trabajo se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7. Compuestos químicos usados en este trabajo**

Nombre del compuesto	Proveedor	Almacenamiento
1 KB plus DNA Marker	Enzimax	4 °C
40% Acrylamide/Bis Solution 37,5:1	Bio-Rad	4 °C
Acetato de amonio ( $NH_4Ac$ )	Merck	Temperatura ambiente
Acetato de potasio (KAc)	Merck	Temperatura ambiente
Acetato de sodio (NaAc)	Sigma	Acetato potásico (KAc)

Tabla 7. Continuación

Nombre del compuesto	Proveedor	Almacenamiento
Acetonitrilo (CH <sub>3</sub> CN)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido aurintricarboxílico (ATA)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido $\alpha$ -cianohidroxicinámico	Sigma	- 20 °C
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido glutámico sal monosódica	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido ortofosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Panreac	Temperatura ambiente
Ácido poligalacturónico (PGA)	Sigma	Temperatura ambiente
Ácido trifluoroacético (TFA)	Sigma	Temperatura ambiente
ADN ligasa del fago T4	Roche	- 20 °C
Agar bacteriológico (bactoagar)	Oxoid	Temperatura ambiente
Agarosa	Pronadisa	Temperatura ambiente
Ampicilina (sal sódica)	Sigma	4 °C
Anti-Bmh2 ( $\alpha$ -bmh2)	Abnova	- 20 °C
Anti-cabra ( $\alpha$ -goat)	Santa Cruz Biotechnology	4 °C
Anti-conejo ( $\alpha$ -rabbit)	Cell signaling	- 20 °C
Anti-digoxigenina ( $\alpha$ -digoxigenine)	Roche	4 °C
Anti FUS3 ( $\alpha$ -FUS3)	Santa Cruz Biotechnology	4 °C
Anti Mpk1 ( $\alpha$ -Mpk1)	Santa Cruz Biotechnology	4 °C
Anti p44/42 MAPK ( $\alpha$ p44/p42 MAPK)	Cell signaling	- 20 °C
Anti rata ( $\alpha$ -rat)	Santa Cruz Biotechnology	4 °C
Anti tubulina ( $\alpha$ -tubuline)	Santa Cruz Biotechnology	4 °C
Azida sódica (NaN <sub>3</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Azul Brillante-R-250	Sigma	Temperatura ambiente
Azul de bromofenol	Sigma	Temperatura ambiente
Azul de xilencianol (Xylencianol FF standard)	Flucka	Temperatura ambiente
Blanco de calcofluor (CFW)	Sigma	Temperatura ambiente
Bradford	Bio-Rad	4 °C
Bicarbonato de amonio ((NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Bromuro de etidio	Amresco	Temperatura ambiente
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	Sigma	Temperatura ambiente
Casaminoácidos	Difco	Temperatura ambiente
CDP-STAR	Roche	4 °C
CHAPS	Sigma	Temperatura ambiente
Citrato de sodio	Merck	Temperatura ambiente
Clorato de potasio (KClO <sub>3</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> )	Merck	Temperatura ambiente



Tabla 7. Continuación

Nombre del compuesto	Proveedor	Almacenamiento
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de litio (CLi)	Merck	Temperatura ambiente
Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Cloruro de sodio (NaCl)	Merck	Temperatura ambiente
Cóctel inhibidor de proteasas	Sigma	- 20 °C
Dihidrogenofosfato de sodio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Dig DNA Labeling Mix	Roche	- 20 °C
DIG Easy Hyb Granules	Roche	Temperatura ambiente
Dihidrogenofosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Dimetil sulfoxido (DMSO)	Merck	Temperatura ambiente
Disodio hidrogenofosfato (Na <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Ditiotreitol (DTT)	Sigma	4 °C
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Serva	Temperatura ambiente
Etanol	Panreac	Temperatura ambiente
Extracto de levadura	Merck	Temperatura ambiente
Fleomicina	InvivoGen	- 20 °C
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma	Temperatura ambiente
Fluoruro de sodio (NaF)	Sigma	Temperatura ambiente
Fosfatasa alcalina de gamba	Roche	- 20 °C
FM4-64	Invitrogen	Temperatura ambiente
β-Glicerofosfato sal sódica	Sigma	Temperatura ambiente
Glicerol	Merck	Temperatura ambiente
Glicina	Merck	Temperatura ambiente
iQ SyBR Green Supermix	Bio-Rad	- 20 °C
Glucanex®-100G (mezcla de enzimas líticas)	Novozymes	4 °C
Glucosa	VWR Prolabo®	Temperatura ambiente
Glutamina	Sigma	Temperatura ambiente
Hidróxido de potasio (KOH)	Merck	Temperatura ambiente
Hidróxido de sodio (NaOH)	Merck	Temperatura ambiente
Higromicina B (HidroGold™)	InvivoGen	- 20 °C
Hipoxantina	Sigma	Temperatura ambiente
Isopropanol	Merck	Temperatura ambiente
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	Apollo	- 20 °C
Lisozima	Sigma	- 20 °C
Manitol	Sigma	Temperatura ambiente
β-mercaptoetanol	Merck	4 °C

Tabla 7. Continuación

Nombre del compuesto	Proveedor	Almacenamiento
MES monohidrato	Sigma	Temperatura ambiente
Metanol	J.T. Baker	Temperatura ambiente
MOPS	Sigma	Temperatura ambiente
N; N; N; N-Tetrametiletilenediamina (TEMED)	Sigma	4 °C
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Nitrito de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> )	Panreac	Temperatura ambiente
Nitrito de sodio (NaNO <sub>2</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Octanol	Panreac	Temperatura ambiente
Ortovanadato de sodio (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Pectina cítrica	Sigma	Temperatura ambiente
Persulfato de amonio (APS)	Sigma	Temperatura ambiente
Pirofosfato de sodio (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
PhosSTOP (phosphatase Inhibitor cocktail tablets)	Roche	4 °C
Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	Merck	Temperatura ambiente
Potato Dextrose Agar (PDA)	Scharlau	Temperatura ambiente
Prolina	Sigma	Temperatura ambiente
ProSieve® Quad Color (marcador de tamaño de proteínas)	ProSieve	- 20 °C
Rapamicina	Sigma	- 20 °C (oscuridad)
Ribonucleasa A (ARNasa)	Fermentas	- 20 °C
RNasin® Plus (Inhibidor de ARNasa)	Promega	- 20 °C
Rojo Congo (CR)	Sigma	Temperatura ambiente
Sacarosa	Merck	Temperatura ambiente
Sero albúmina Bovina fracción V (BSA)	Roche	4 °C
Sorbitol	Sigma	Temperatura ambiente
Skin-milk	Difco	Temperatura ambiente
Sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> )	Merck	Temperatura ambiente
Sulfito de sodio (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	Sigma	Temperatura ambiente
Sypro Ruby (SYPRO®Ruby Proteins Stains)	Bio-Rad	Temperatura ambiente
Tiourea	Merck	Temperatura ambiente
Tripsina	Promega	- 20 °C
Triptona	Merck	Temperatura ambiente
Titriplex®I (EDTA)	Merck	Temperatura ambiente
Tripure Isolation Reagent	Roche	4 °C
Tritón X-100	Sigma	Temperatura ambiente

Tabla 7. Continuación

Nombre del compuesto	Proveedor	Almacenamiento
Trizma base	Sigma	Temperatura ambiente
Tween 20	Sigma	Temperatura ambiente
Urea	Sigma	Temperatura ambiente
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido)	Sigma	- 20 °C
Yodoacetamida	Sigma	4 °C
Yoduro de sodio (NaI)	Sigma	Temperatura ambiente
Kit	Proveedor	Almacenamiento
Bio-Rad DC™ protein Assay	Bio-Rad	Temperatura ambiente
BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline	- 20 °C
DNase I kit	Fermentas	- 20 °C
Expand High Fidelity PCR System	Roche	- 20 °C
GeneClean® Turbo	MP	Temperatura ambiente
ECL-Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare	4 °C
LumiGlo	Cell signaling	4 °C
M-MLV reverse Transcriptase kit	Invitrogen	- 20 °C
pGEM®-T Vector System	Promega	- 20 °C
pSpark® I DNA cloning system	Canvax	- 20 °C

## 1.5. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación, secuenciación y extensión se diseñaron con el programa Oligo (versión 6.65; *Molecular Biology Insights, Inc. USA*), optimizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillas no deseadas, así como diversos parámetros físico químicos ( $T_m$ ,  $(2A+T)^{\circ}+4(G+C)^{\circ}$ ). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por diversas casas comerciales (Bonsai Technologies y Eurofins MWG Operon). Las secuencias terminales incluidas en los oligonucleótidos para favorecer la hibridación con el extremo 3' o 5' de los casetes de resistencia a higromicina o fleomicina aparecen en minúscula.

Tabla 8. Oligonucleótidos generales

Oligo	Secuencia (5'→3')	Oligo	Secuencia (5'→3')
<b>M13-For</b>	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	<b>hyg-Y</b>	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
<b>M13R</b>	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	<b>hyg-G</b>	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
<b>hph2</b>	AAACCGACGCCCCAGCACTC	<b>hph6</b>	TCGTTATGTTTATCGGCACCTT
<b>PgpdA15B</b>	CGAGACCTAATACAGCCCCT	<b>Leo</b>	GCCACGAAGTGCACGCAGTT
<b>TtrpC8B</b>	AAACAAGTGATCTGTGCATTC	<b>PHL</b>	ATGTGACCAGTGCCGTTCCG

Tabla 9. Oligonucleótidos específicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Oligo	Secuencia (5'→3')	Oligo	Secuencia (5'→3')
<b>fbp1-1</b>	GCAAACGCTGGGCTAGAAACA	<b>bmh1-3</b>	ATCTCCTATCTTCTACACCAA C
<b>fbp1-2</b>	TGTCGGTCATTCAGTTCATCG	<b>bmh1-4</b>	tggtcgtttagggctgtattaggtctcg TGGTGTCTACGGAGTGTGGA
<b>fbp1-3</b>	GTCAGTCATCTTCCCGCAG	<b>bmh1-5</b>	ATTGCGTCTGGAGTTCTGG
<b>fbp1-4</b>	GCCTCCCTATTTCCCTTCTC	<b>bmh1-6</b>	GAGAAGAGCGATTGTCCATTG
<b>fbp1-5</b>	TCCCCGAGCAACAACAGATA	<b>bmh1-7</b>	AGGGGCGTTGAGGATTTCTG
<b>fbp1-6</b>	TCCCTTCTCTACAATGACACC	<b>bmh1-8</b>	GCAGAAGGAGGAGTCAAAGG
<b>fbp1-7</b>	TGGTCAGGTACGTGGAAGAGT	<b>FOHYD5-1</b>	GTTCTTGGAGTTGCCAACCT
<b>fbp1-M13-1</b>	gtgactgggaaaacctggcgAGAACT CCGATGCTTGACTGAG	<b>FOHYD5-3</b>	ATAGGCGAGCACAGCATCG
<b>fbp1-M13-2</b>	tcctgtgtgaaattgttatccgct ACGAT GAAGTGAATGACCGACA	<b>FOHYD1-1</b>	ATGGCGTCTCCGTTGGTAA
<b>fbp1-9</b>	TTGTGGAGAATAGCACCTCGT	<b>FOHYD1-3</b>	TGAGGGATGGGAAGGCTGG
<b>fbp1-10</b>	GACAGTTGCCCTTGACCATAA	<b>FOXG_12535-1</b>	TGCTGGAAAGACTCTGGACC
<b>bmh2-1</b>	CACCATCAAGGACTACCGCA	<b>FOXG_12535-2</b>	GCCGTTTCCCAGATAGTAAT
<b>bmh2-2</b>	GAAGACGGAGAAAGTTGAGAG	<b>act-2</b>	GAGGGACCGCTCTCGTCGT
<b>bmh2-3</b>	Tttaccagaatgcacaggtacactgttt AAGGAAGTGGAAGTAGTCGTG	<b>act-q6</b>	GGAGATCCAGACTGCCGCTCAG
<b>bmh2-4</b>	GCAGAGACAACAACAACAAGC	<b>PI1-F</b>	CCT ACT GCT GTT CCT GTC A
<b>bmh2-5</b>	GCCGCAAAGGAGACATTAGC	<b>PI1-R</b>	TCC ACT GGT CTG CTTGAG G
<b>bmh2-6</b>	Tggtcgtttagggctgtattaggtctcg ACAACCTCACCTCTGGACT	<b>FOXG_14695F</b>	GCAGCGTCACTGACTACTCC
<b>bmh2-6 M13R</b>	Tcctgtgtgaaattgttatccgct ACAACCTCACCTCTGGACT	<b>FOXG_14695R</b>	GTTAGAACCTTCGCCATCCCA
<b>bmh2-7</b>	ACTTCGGA AAAACCCATAGCAG	<b>FOXG_13051F</b>	GCCTGGTCGCTCCGTA
<b>bmh2-8</b>	GCGAACGGAAAGACGGAACA	<b>FOXG_13051R</b>	TCTTCTTGCCGCCGTTGCTG
<b>bmh2-9</b>	GTCTATATCATCCCTCC CG	<b>FOXG_08862F</b>	GTACAGCATTGCCTCGCCAC
<b>bmh2-10NotI</b>	<b>GCGGCCG</b> CAGGGAGTCGAGCTCGG CAAT	<b>FOXG_08862R</b>	CGGGTTTCTCATTGCGAGGTT
<b>bmh2-11</b>	CGTCGTATCGCTGACATCGT	<b>bmh1-A189S1</b>	ACGAAATCCTCAACTCCCCTG
<b>bmh1-1</b>	tttaccagaatgcacaggtacactgttt GATGTTAGCGACTGTGTTTG	<b>bmh1-A189S2</b>	CAGGGGAGTTGAGGATTTCTG
<b>bmh1-2</b>	AAGTTCCAA GGTCCAGCCAG		

## 1.6. Programas informáticos y páginas webs

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

**Tabla 10. Programas informáticos y páginas webs para el análisis de datos**

Programa	Aplicación
Adobe illustrator CS5	Elaboración y tratamiento de figuras
Adobe photoshop CS5	Edición de imágenes
Vector NTI® AlignX (Invitrogen).	Alineamiento de secuencias
Vector NTI®3D Molecule Viewer (Invitrogen)	Edición imágenes 3D
AxioVision Rel 4.8	Edición y análisis del estereomicroscopio
Bio-Rad iQ5	Obtención y análisis de datos de datos de qPCR
EndNoteX7	Editor de referencias y bibliografía
GraphPad Prism (v5.00)	Elaboración de gráficos
ImageJ	Edición de imágenes
Image Reader LAS-3000 (FujiPhotoFilm)	Captura, edición y análisis de imágenes obtenidas tras revelado mediante detección quimioluminiscente
Kodak 1D Image Análisis	Captura de imágenes fotográficas de geles de agarosa
Leica IM500 V1.2	Edición de imágenes de microscopio y lupa
Oligo 6	Diseño y análisis de oligonucleótidos
PDQUEST v 8.0.1 Bio-rad	Análisis de las diferencias de expresión de proteínas
SeqBuilder (DNASTar Lasergene (v. 7.0.0))	Edición y análisis de secuencias nucleotídicas o proteicas
Páginas Webs	Aplicación
Broad Institute <i>Fusarium</i> Comparative Database ( <a href="http://www.broadinstitute.org">http://www.broadinstitute.org</a> )	Búsqueda de secuencias nucleotídicas o proteicas de <i>Fusarium</i>
Emboss epestfind ( <a href="http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/epestfind">http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/epestfind</a> )	Buscador de dominios PEST en secuencias proteicas
ExPASy-Prositate database ( <a href="http://prosite.expasy.org/">http://prosite.expasy.org/</a> )	Predicción de dominios
Gene Ontology (GO) ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Asignar a proteínas categorías funcionales en función del proceso biológico en el que estén implicadas
Mascot 2.0 (MatrixScience)	Motor de búsqueda que usa datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en bases de datos
National Center for Biotechnology Information (NCBI) ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )	Análisis y comparación de secuencias nucleotídicas o proteicas análogas usando el algoritmo BLAST
Phylogeny ( <a href="http://www.phylogeny.fr/">http://www.phylogeny.fr/</a> )	Elaboración de árboles filogenéticos
PSIPRED ( <a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a> )	Predicción de estructuras secundarias de proteínas
SMART ( <a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a> )	Predicción de dominios
SwissModel Workspace ( <a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a> )	Predicción de estructuras 3D de proteínas
M-Coffee ( <a href="http://www.tcoffee.org/Projects/mcoffee/">http://www.tcoffee.org/Projects/mcoffee/</a> )	Herramienta para el alineamiento de secuencias
UniProtKB ( <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a> )	Predicción de dominios

## 1.7. Instrumentación

La instrumentación utilizada durante este trabajo se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Instrumentación**

Instrumento	Aplicación
Agitador magnético MC-8 Bunsen	Homogenizar muestras de gran volumen
Autoclave Presoclave P-Selecta	Esterilización de materiales y medios
Balanza LE225D Sartorius/Balanza precisión Cobos	Pesar compuestos y muestras biológicas
Cabina de flujo laminar Burdinola AV-100	Mantenimiento de la esterilidad
Centrífuga J2-HS Beckman	Centrifugación de muestras(50-200 mL)
Centrífuga MiniSpin Eppendorf	Centrifugación de muestras (1,5-2 mL)
Escáner Perfection 4490 Photo Epson	Escanear muestras biológicas
Espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop®	Cuantificación de ácidos nucleídos
Estación Investigator™ ProPic	Escisión de los spots de los geles de acrilamida
Estación de digestión ProPrep II	Digestión de las spot de los geles de acrilamida
Estación de hibridación Oven/Shaker S120H Stuart Scientific	Hibridación de membranas (Southern)
Esteriomicroscopio Zeiss Lumar V12	Obtención de imágenes
Homogenizador MINI BEADBEATER-8 BiosPEC	Homogenización de muestras usando bolas de vidrio
Incubador Heraeus (Thermo scientific)	Incubación a temperatura variable de muestras
Incubador Infors HT Multitron Standard	Incubación en agitación y temperatura variable de muestras líquidas
MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer	Identificación de proteínas por huella peptídica
Máquina fotográfica Coolpix S5 Nikon	Obtención de imágenes fotográficas
Máquina fotográfica DC290 ZOOM Kodak	Obtención de imágenes fotográficas de geles de agarosa
Microscopio Leica DMR/ Leica MZFLIII	Obtención de imágenes
Molecular Imager FX Pro Plus Multi-Imager System Bio-Rad	Escanear geles de acrilamida
pHmetro BASIC 20+ Crison	Medición del pH de muestras
Protean IEF Cell System Bio-Rad	Separación de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque
Protean Plus Dodeca Cell Bio-Rad	Separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular mediante SDS-PAGE
Revelador LAS-3000 Fujifilm	Revelado de imágenes de membranas de hibridación
SpeedVac Savant DNA 120 Concentrator Thermo Scientific	Concentración de muestras mediante vacío
Termobloque ThermoStat Plus Eppendorf	Incubación a temperatura constante de viales (1,5 o 2 mL)
Termociclador MJ Mini™ Personal Thermal Cycler BioRad	Amplificación de ADN mediante PCR
Termociclador iCycler iQ real-time PCR system BioRad	Cuantificación de la expresión génica mediante RT-Q-PCR
Termociclador TC-3000G Techne	Amplificación de ADN mediante PCR
Vortex MS2 Minishaker IKA®	Homogeneización de muestras de volumen pequeño

## 2. Métodos

### 2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos

#### 2.1.1. Bacterias

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

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

#### 2.1.2. Hongos: *Fusarium oxysporum*

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

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

#### 2.1.3. Plantas

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

## 2.2. Aislamiento de ácidos nucleicos

### 2.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico (ADNp) de *E. coli* con CTAB (minipreps)

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

Se partió de un cultivo estacionario de la estirpe portadora del plásmido crecido en 5 mL de medio LB con la selección apropiada. Se centrifugaron 3 mL de este cultivo durante 2 minutos a 13.000 rpm y tras retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de STET<sup>(1)</sup>. A continuación se añadieron 4  $\mu$ L de lisozima (50 mg/mL) para provocar la lisis celular y 2  $\mu$ L de RNasa A (10 mg/mL) para eliminar el ARN contaminante y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente la muestra se calentó a 100°C durante 45 segundos y se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. Los restos celulares de aspecto mucoso se retiraron con un palillo estéril, se añadieron 10  $\mu$ L de CTAB<sup>(2)</sup> para precipitar el ADN y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 5 minutos a 13.000 rpm se desechó el sobrenadante y el ADN se resuspendió en 300  $\mu$ L de una solución 1,2 M de NaCl y 750  $\mu$ L de etanol frío al 100%. Se homogeneizó bien y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 70% etanol (v/v), se secó mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 20  $\mu$ L 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).

<sup>(1)</sup>STET: 8% sacarosa (p/v); 0,1% Tritón X-100 (v/v); 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8.

<sup>(2)</sup>CTAB: 5% bromuro de hexadeciltrimetilamonio (p/v). Mantener a 37°C para evitar que precipite.

### 2.2.2. Extracción de ADN de *F. oxysporum*

#### Método del CTAB

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

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



Con ayuda de un mortero, se pulverizaron unos 100 mg de micelio en nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial de 2 mL que contenía 1 mL de tampón de extracción CTAB<sup>(1)</sup>. Se homogenizó vigorosamente, se añadieron 4 µL de β -mercaptoetanol y 500 µL de una solución cloroformo:octanol (24:1, v/v), y se incubó a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de 100% etanol frío y se mantuvo a -20°C durante 10 minutos, tras lo cual el ADN se precipitó haciéndose visible con aspecto de maraña blanquecina. Después se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm; 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) y el ADN se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril. Por último, se añadieron 4 µL de RNasa A (10 mg/mL) y se continuó el tratamiento a 37°C durante al menos 30 minutos.

<sup>(1)</sup>**Tampón de extracción CTAB:** 12,1 g/L Trizma base; 7,44 g/L EDTA; 81,8 g/L NaCl y 20 g/L bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Para disolver, calentar a 60°C y ajustar a pH 8,0 con NaOH. Llevar a 100 mL y almacenar a 37°C para evitar que precipite.

### **Método de rotura con bolas de vidrio (Glass Beads)**

Para la obtención de ADNg por el método “Glass Beads” se utilizó el micelio obtenido de una colonia de 1 cm<sup>2</sup> del hongo en medio sólido. Este método requiere el uso de pequeñas bolas de cristal de 425–600 µm de diámetro estériles (Glass Beads; Sigma). En un tubo estéril de 2 mL se añadieron aproximadamente 0,3 g de Glass Beads, 500 µL de tampón de lisis<sup>(1)</sup> y el micelio previamente fragmentado con una espátula de metal esterilizada. Las muestras se agitaron en un vortex durante 1 minuto y a continuación en un *Mini Beadbeater* tres veces durante 20 segundos. En este proceso las bolas de cristal machacan el micelio hasta dejar partículas finas. A continuación se centrifugó 2 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 275 µL de una solución 7 M de acetato de amonio pH 7,0. Seguidamente las muestras se incubaron 5 minutos a 65°C y otros 5 minutos en hielo para finalmente añadir 500 µL de cloroformo y ser homogeneizadas en un vortex. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 13.000 rpm. La fase superior resultante se transfirió a un tubo de 2 mL al que se le añadió 1 mL de isopropanol; se homogeneizó vigorosamente por vortex, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. El pellet resultante se lavó dos veces añadiendo 1 mL de etanol al 70% (v/v),

centrifugando 5 minutos a 13.000 rpm y eliminando el sobrenadante. Finalmente las muestras se secaron en un *SpeedVac* y se resuspendieron en 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril. Por último, se añadieron 4  $\mu$ L de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante al menos 30 minutos.

<sup>(1)</sup>**Tampón de lisis:** 100 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA; 1% SDS.

### 2.2.3. Extracción de ARN de *F. oxysporum*

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas para cada experimento. Para obtener dicho micelio,  $1,25 \times 10^8$  esporas frescas se reinocularon en 50 mL de medio PDB y se incubaron a 28°C en agitación durante 12-14 horas. Pasado este tiempo, se recogieron por filtración las germínulas obtenidas, a través de un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15  $\mu$ m) y se lavaron repetidas veces con agua desionizada para retirar el exceso de PDB. A continuación, las germínulas se transfirieron al medio de inducción deseado manteniéndolas en las condiciones deseadas. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, se recogió el micelio por filtración y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido almacenándolo a -80°C hasta su uso.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron con ayuda de un mortero unos 100 mg de micelio en nitrógeno líquido, y se introdujeron en un vial de 2 mL con 1 mL de *Tripure Isolation Reagent* (Roche). Se homogenizó vigorosamente usando un vortex y se centrifugó a 4°C, durante 10 minutos y 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 4°C durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente durante unos 15 segundos y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Tras centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos, la mezcla se separó en tres fases, de las cuales, la fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un vial con 500  $\mu$ L de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión, y se incubó a 4°C durante 10 minutos, tras lo cual, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos y 13.000 rpm, para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de 75% etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 4°C durante 5 minutos y 10.000 rpm, se secó en un *SpeedVac* y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua libre de ARNasas. Posteriormente se incubó a 55-60°C durante 10-15 minutos para facilitar la resuspensión del ARN, el cual se conservó a -80°C.

Por último, se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó la calidad del ARN por visualización en gel de 0,7% agarosa (p/v).

## **2.3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

### **2.3.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa disuelta en tampón TAE<sup>(1)</sup>. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0,7 y 2% (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Cada muestra se mezcló con tampón de carga<sup>(2)</sup> para geles de agarosa en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm.

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*).

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

<sup>(1)</sup> **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8,0.

<sup>(2)</sup> **Tampón de carga:** 0,25% azul de bromofenol (p/v); 0,25% azul de xilencianol (p/v) y 40% sacarosa (p/v) en 5 x TAE.

### **2.3.2. Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa**

La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó empleando el kit comercial *GENECLEAN® Turbo kit* (MP), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y el pH adecuado para la unión del ADN a la membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

### 2.3.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

- **Tratamiento con endonucleasas de restricción**

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por las casas comerciales Roche y Fermentas. Los tratamientos del ADN con una única enzima de restricción se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se utilizaron 1-2 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10% del volumen total. En el caso de los tratamientos de ADN<sub>g</sub> para análisis Southern, se digirieron 1-2  $\mu\text{g}$  de ADN<sub>g</sub> con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima durante, normalmente, no más de 3 horas. Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico.

- **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.

La reacción se llevó a cabo usando la fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (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.

- **Clonación de fragmentos de ADN en vectores**

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

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial *pGEM<sup>®</sup>-T Vector System* (Promega) o el kit *pSpark<sup>®</sup>I DNA cloning system* (Canvax), siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera rutinaria, antes de la clonación los fragmentos se precipitaron con acetato de amonio y etanol puro, o bien, se purificaron utilizando el Kit comercial *GENECLEAN<sup>®</sup>*.

### **2.3.4. 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*<sup>®</sup> *ND-1000*. Habitualmente, se cuantificó por comparación de la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño *1 KB plus DNA Marker* (Enzimax), tras electroforesis en gel de agarosa.

### **2.3.5. Hibridación y detección de ácidos nucleicos**

La transferencia de ADN en gel de agarosa para análisis *Southern* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Sambrook et al, 2001). Para el marcaje de la sonda no isotópica con digoxigenina se usó un kit comercial (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **2.3.6. Precipitación del ADN**

La precipitación del ADN se llevó a cabo bien para eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes de una PCR donde el producto era único, o bien, cuando fue necesario concentrar el ADN a un volumen menor (fragmentos de PCR o ADNg).

#### **Precipitación rutinaria 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 13.000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, se lavó dos veces el sedimento con 70% etanol (v/v), se dejó secar y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

#### **Precipitación de sondas marcadas con digoxigenina**

La precipitación de sondas marcadas se realizó añadiendo un 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 13.000 rpm. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µL de agua desionizada.

### 2.3.7. Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN fue realizada en el Servicio de Secuenciación Automática, 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), o en STABVIDA (Portugal), tanto de amplicones obtenidos por PCR como de plásmidos recombinantes.

## 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 2.4.1. PCR estándar

Las amplificaciones estándares de ADN se llevaron a cabo en un termociclador y, según la finalidad del experimento, se emplearon polimerasas termoestables (*BIOTAQ™ DNA polymerase de Boline* o *Expand High Fidelity PCR System de Roche*), en las condiciones de reacción indicadas en las instrucciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 nM de cada uno de los dos cebadores empleados, la concentración de MgCl<sub>2</sub> adecuada, 0,8 mM de la mix de dNTPs y 0,05 U/μL de polimerasa. La cantidad de ADN molde empleada fue aproximadamente de 5-20 ng/μL de ADN genómico o 1-2 ng/μL de ADN plasmídico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 12. Condiciones estándar de la PCR.**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Unión al cebador	T <sub>un</sub>	30 segundos	35
Extensión	72°C/68°C <sup>(1)</sup>	T <sub>ext</sub>	
Extensión final	72°C/68°C <sup>(1)</sup>	10 minutos	1
	10°C	Indefinido	-

<sup>(1)</sup>Cuando se empleó la *Expand High Fidelity* y el T<sub>ext</sub> fue mayor de 3 minutos la temperatura fue 68°C.

T<sub>un</sub> es la temperatura de unión de los cebadores al molde y T<sub>ext</sub> el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 minuto por cada kb de producto.

### 2.4.2. Construcción de alelos mutados por interrupción génica

La interrupción de genes de *F. oxysporum* se llevó cabo mediante reemplazamiento génico dirigido usando las siguientes técnicas:

#### Construcción de alelos interrumpidos mediante PCR de fusión

Protocolo basado en los descritos por Yang *et al.* (2004) y Yu *et al.* (2004), con ciertas modificaciones. La PCR de fusión es una técnica muy útil a la hora de generar alelos interrumpidos o fusiones traduccionales, ya que permite ahorrar mucho tiempo en relación con las estrategias de clonación clásicas.

Gracias a esta técnica es posible obtener alelos interrumpidos en dos rondas de PCR (figura 9) listos para transformar. En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias adyacentes del gen a interrumpir (1,0-1,5 kb) y el gen marcador (higromicina B o fleomicina). La amplificación del gen de resistencia, que debe ser perfectamente funcional, se realizó con el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) y utilizando como moldes los plásmidos pAN7-1 y pAN8-1 respectivamente; La amplificación de las secuencias flanqueantes al gen diana se llevó a cabo con el mismo kit, pero usando ADN<sub>g</sub> como molde. Los cebadores internos del gen a interrumpir deben llevar una cola complementaria, de al menos 25 nucleótidos, a los extremos del gen de resistencia, que permita la posterior hibridación de las secuencias en la segunda ronda de PCR. Una vez amplificados, purificados y cuantificados los tres fragmentos se pasó a la segunda ronda de PCR.

En la segunda y última ronda de PCR se utilizaron como molde los tres fragmentos obtenidos en la primera, en una relación 1:3:1 (secuencia flanqueante 1:marcador:secuencia flanqueante 2) y sin que el total de ADN excediera de 500 ng para una PCR de 50 µL. Los cebadores empleados, para esta ronda de PCR, fueron diseñados ligeramente más hacia dentro de los más externos utilizados para amplificar las secuencias flanqueantes en la primera ronda. La amplificación del alelo interrumpido íntegro se realizó con el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). El producto final se purificó, se cuantificó y almacenó a -20°C hasta su uso.

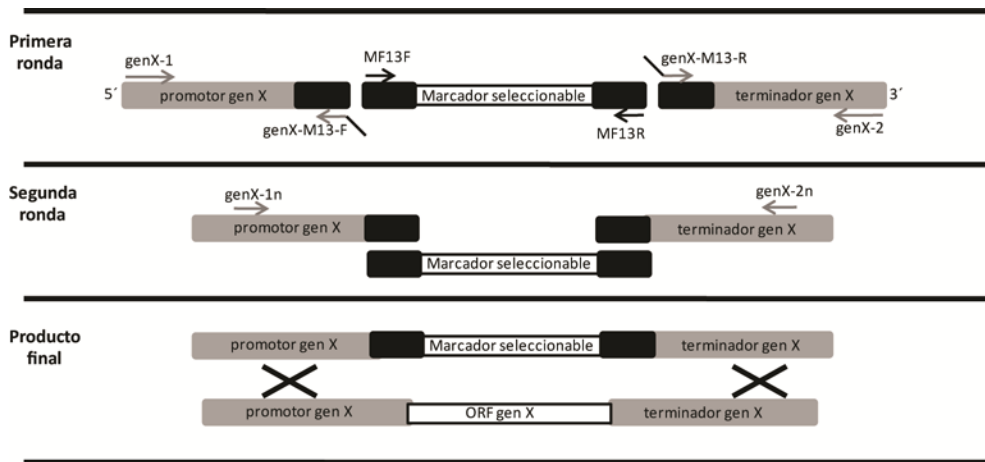


Figura 9. Construcción de un alelo interrumpido mediante PCR de fusión

### Construcción de alelos interrumpidos mediante *Split Marker*

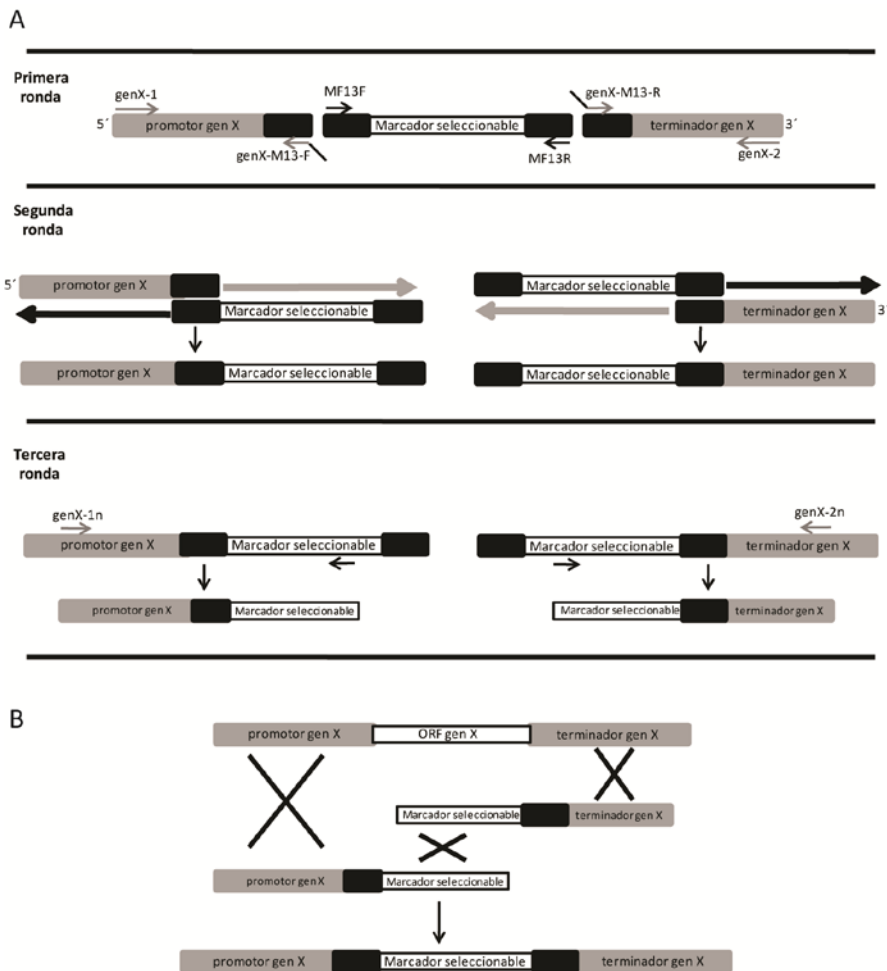
Protocolo basado en el descrito por Catlett *et al.* (2003). Igualmente, esta técnica es muy ventajosa a la hora de generar alelos interrumpidos, ya que al forzar el mecanismo de doble recombinación reduce, en gran medida, los falsos positivos obtenidos por recombinación heteróloga.

Gracias a esta técnica, es posible obtener dos fragmentos de ADN solapantes en tres rondas de PCR (figura 10A). En la primera ronda de PCR se amplificaron las secuencias adyacentes del gen a interrumpir (1,0-1,5 kb), usando el ADN<sub>g</sub> del hongo como molde, y el gen marcador (higromicina B o fleomicina), obtenido también por PCR a partir de un vector portador de dicho casete. En la segunda ronda de PCR se obtienen dos amplicones: uno de los fragmentos contiene la secuencia promotora del gen diana fusionada al extremo 3' del casete de resistencia usado (higromicina o fleomicina) mediante PCR de fusión (Carroll *et al.*, 1994), y el otro fragmento contiene la región terminadora del gen diana fusionada al extremo 5' del casete de resistencia. Para conseguir que ambos fragmentos queden fusionados, los oligonucleótidos del gen diana fueron diseñados con 30 nucleótidos en el extremo 5' complementarios al extremo 3' o 5' del casete de resistencia, y por lo tanto eran susceptibles de fusionar con dicho casete. Por último, se realizó la tercera ronda de PCR. Se usaron oligonucleótidos específicos del interior del casete de resistencia y de la región flanqueante del gen diana, de modo que



cada construcción era portadora de aproximadamente el 75% de cada extremo del casete de resistencia, incluyendo una región complementaria en ambas construcciones.

Para la obtención de mutantes con alelos deletados se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum*, empleando las dos construcciones solapantes obtenidas anteriormente. El hecho de recombinación esperado es la sustitución homóloga del gen diana por el casete de resistencia (figura 10B). Para ello, las dos construcciones deben recombinar entre sí en el interior del hongo, obteniéndose una única construcción con el casete de resistencia completo y funcional, que a su vez deberá recombinar de manera homóloga en el gen diana, sustituyendo el alelo silvestre por el casete de resistencia.



**Figura 10. Esquema de interrupción génica mediante la técnica de *Split Marker*. (A).** Obtención de construcciones. **(B).** Suceso de recombinación doble que se espera que ocurra en el interior de los protoplastos de *F. oxysporum*

### 2.4.3. Transcripción inversa: síntesis de ADN copia (ADNc)

En primer lugar, el ARN purificado se trató con el kit *DNase I* de Fermentas que incluye tratamiento con ADNasa durante 30 minutos a 37°C, a razón de 0,1 µg/µL de ARN y 0,1 U/µL de enzima. Para detener esta reacción se incubó la mezcla a 65°C durante 10 minutos, añadiendo EDTA a concentración final 2,5 mM para prevenir la hidrólisis del ARN durante el calentamiento.

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

Se mezclaron 2 µg de ARN total con 200 pmol de cebador oligo-dT y 0,8 mM de dNTPs; la mezcla se llevó hasta 18 µL con agua desionizada estéril y se incubó a 65°C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se introdujo en hielo rápidamente y se añadió 1x tampón *First Strand Buffer* (kit M-MLV, Invitrogen), 4 U/µL del inhibidor de ARNasas *RNasin®Plus RNase Inhibitor* (Promega) y 5 mM de Ditioneitol (DTT) (kit M-MLV, Invitrogen). Se incubó a 37°C durante 2 minutos y, transcurrido ese tiempo, se añadió la retrotranscriptasa (10 U/µL), incubando la reacción a 37°C durante 50 minutos más. Por último, para inactivar la enzima, se calentó a 70°C durante 15 minutos.

### 2.4.4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado (3 repeticiones técnicas a partir de los ADNc de 3 réplicas biológicas). Se usaron placas de 96 pocillos (BioRad) en un equipo *iCycler iQ Real-time PCR System* (BioRad). Por cada reacción se añadieron 7,5 µL de *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad), 6,9 µL de ADNc 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:

**Tabla 13. Condiciones de amplificación de la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión génica.**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº 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	
Determinación de la fluorescencia	80°C	20 segundos	

Para analizar los productos obtenidos tras la PCR se realizaron las curvas de desnaturalización (curvas de *Melting*). Para ello se programó el equipo para aumentos de 0,5°C cada 5 segundos, comenzando a los 55°C hasta alcanzar los 95°C, determinándose la fluorescencia tras cada aumento de temperatura.

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

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

Los niveles de expresión relativa se calcularon siguiendo el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), siendo los valores de  $C_t$  normalizados según el valor  $C_t$  obtenido para el gen actina usado como gen de referencia endógena. Los valores de  $C_t$  obtenidos experimentalmente eran considerados como válidos si la dispersión de los datos de cada triplicado era tal que su desviación típica era menor a 0,5.

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

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_p} - C_{t_c})_{T_{to}} - (C_{t_p} - C_{t_c})_{Ref}$$

Rp: Expresión relativa del gen problema con respecto a la del gen control

P: Gen problema

C: Gen control

Ref: Condiciones de referencia

Tto: Condiciones de tratamiento

### 2.4.5. PCR de marcaje

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

## 2.5. Transformación genética

### 2.5.1. Transformación de *Escherichia coli*

Para obtener y transformar células competentes se siguió un protocolo basado en el descrito por Hanahan (1985), con algunas modificaciones.

### Obtención de células competentes

Una colonia fresca de *E. coli* XL1-Blue o *E. coli* DH5 $\alpha$  se inoculó en 5 mL de PSI-b<sup>(1)</sup> y se incubó 12 horas a 37°C con agitación. El cultivo estacionario se transfirió a 100 mL de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37°C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la densidad óptica a 550 nm fue de 0,45-0,5. A continuación, se enfrió el cultivo en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 7.000 rpm. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 mL de solución Tfb-1<sup>(2)</sup> fría. Tras una incubación de 5 minutos en hielo se volvieron a centrifugar a 7.000 rpm y a 4°C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 mL de solución Tfb-2<sup>(3)</sup> fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 minutos, se repartieron en alícuotas de 100  $\mu$ L en viales previamente enfriados y se conservaron a -80°C hasta su uso.

<sup>(1)</sup>**PSI-b:** 5 g/L extracto de levadura; 20 g/L triptona y 5 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O. Ajustar a pH 7,6 con KOH. Esterilizar en autoclave.

<sup>(2)</sup>**Solución Tfb-1:** 30 mM acetato potásico pH 6,9; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 15% glicerol (v/v). Esterilizar por filtración.

<sup>(3)</sup>**Solución Tfb-2:** 10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl y 15% glicerol (v/v). Esterilizar por filtración.

## Transformación de células competentes

Se usaron 50  $\mu\text{L}$  de células competentes, descongeladas en hielo, a las que se les añadió 5  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN y se incubaron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 1 minuto e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 minutos. Para permitir la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante 15 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de medio LB. Por último, se sembró toda la mezcla de transformación en placas de medio selectivo, y se incubaron a 37°C durante 12-14 horas.

### 2.5.2. Transformación genética de *F. oxysporum*

#### Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (1990) con ciertas modificaciones.

Esporas del hongo de la estirpe deseada congeladas en glicerol se inocularon en medio PDB y se cultivaron de 3-5 días a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo se recogieron las esporas frescas y se inocularon  $5 \times 10^8$  en 200 mL de PDB. Tras 12-14 horas de incubación a 28°C las germínulas obtenidas se recogieron por filtración con un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro 10-15  $\mu\text{m}$ ) y se lavaron con abundante solución OM<sup>(1)</sup>. A continuación, se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 mL de solución OM conteniendo 0,5% (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (*Glucanex* de Novozymes). El tratamiento enzimático se mantuvo 45 minutos a 30°C y agitación suave. Transcurrido este tiempo se comprobó al microscopio la formación de protoplastos. Cuando el número y la calidad fue la adecuada, la muestra se filtró a través de 2 filtros de nailon (Monodur, 10-15  $\mu\text{m}$ ) y se lavó con solución STC<sup>(2)</sup> hasta llenar 4-6 tubos de centrifuga de 30 mL que se mantuvieron en hielo en todo momento. Posteriormente, se centrifugó a 4°C y 3.000 rpm durante 15 minutos utilizando un rotor basculante para recoger los protoplastos obtenidos. Éstos se resuspendieron muy suavemente en 1 mL de solución STC y se determinó su concentración mediante observación al microscopio usando una cámara de Thoma. Se repartieron en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  a una concentración de  $2 \times 10^8$  protoplastos/mL. A

continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 10% de PEG<sup>(3)</sup> (v/v) y 1% de DMSO (v/v).

<sup>(1)</sup> **Solución OM:** 1,2 M  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 5,8-6,0 ajustado con ácido ortofosfórico. Esterilizar por filtración.

<sup>(2)</sup> **Solución STC:** 0,8 M sorbitol; 50 mM  $\text{CaCl}_2$  y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

<sup>(3)</sup> **Solución PEG:** 60% polietilenglicol 6000 (p/v) en 0,6 M MOPS.

## Transformación de protoplastos

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malardier *et al.* (1989), con algunas modificaciones. En un vial se mezclaron 1-2  $\mu\text{g}$  de ADN transformante con 10  $\mu\text{L}$  de 0,1 M de ácido aurintricarboxílico (ATA), fuerte inhibidor de nucleasas, y se llevó a un volumen final de 60  $\mu\text{L}$  con solución TEC<sup>(1)</sup>. También se preparó un control sin ADN consistente en 10  $\mu\text{L}$  de ATA y 50  $\mu\text{L}$  de solución TEC. Para experimentos de cotransformación, se añadió 1,5  $\mu\text{g}$  del ADN que confería la resistencia al antibiótico y el doble de ADN de interés.

Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos, al igual que los protoplastos obtenidos según el protocolo descrito, ya bien fuesen frescos o congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, el ADN fue centrifugado 2 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se mezcló suavemente con los protoplastos y, de nuevo, se volvió a incubar en hielo durante 20 minutos. Seguidamente se añadieron y homogeneizaron lentamente 160  $\mu\text{L}$  de solución PEG y se prolongó la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los cuales se añadió 1 mL de solución TEC. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para recoger los protoplastos y éstos se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de solución STC.

Se mezclaron entonces alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de la solución de protoplastos, que contenían el ADN, con 3 mL de agar de cobertera<sup>(2)</sup> precalentado a  $45^{\circ}\text{C}$  y se sembraron en medio sólido de regeneración que se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo variable en función del antibiótico con el que se seleccionó para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina se mantuvieron 14 horas y para la selección con fleomicina, 90 minutos.

En el caso del control, sin ADN, se realizaron diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en STC, añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas a 3 mL de agar de cobertera y sembrando en placas de medio mínimo de regeneración, con el fin de determinar el porcentaje de regeneración y viabilidad de los protoplastos. Además, se realizó una dilución  $10^{-4}$  en

agua desionizada, lo que provoca la desestabilización de los protoplastos y su consiguiente muerte, de la cual 100  $\mu$ l fueron sembrados con agar de cobertera y sembrados en placas para determinar el porcentaje de esporas presentes. Para el último control se mezclaron 190  $\mu$ l de la solución control con 3 mL de agar de cobertera y se sembraron con el fin de certificar la ausencia de crecimiento en medio selectivo. Estos controles se incubaron a 28 °C el mismo tiempo que las placas que contenían en ADN transformante. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron otros 3 mL de agar de cobertera que contenían el antibiótico de selección, 2 mg de higromicina B ó 0,2 mg de fleomicina, excepto en los controles de regeneración y en el control de esporas. Por último, se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias con fenotipo transformante.

Los transformantes obtenidos se sembraron en placas de PDA selectivas como paso previo a la obtención de colonias puras, originadas a partir de una única spora. Posteriormente, los transformantes obtenidos fueron confirmados mediante amplificación selectiva por PCR y por análisis *Southern*.

<sup>(1)</sup>**Solución TEC:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl<sub>2</sub>.

<sup>(2)</sup>**Agar de cobertera:** 0,4 % de agar (oxid) (p/v) en medio mínimo de regeneración.

## 2.6. Ensayos de patogenicidad

### 2.6.1. Infección de plantas de tomate

Para analizar el patotipo de los mutantes de *F. oxysporum* obtenidos en este trabajo se inocularon plantas de tomate del cultivar MoniKa (Syngenta seeds, Almería, España) o *Money Maker* (La Mayora, CSIC, Málaga) con suspensiones de esporas de las diferentes cepas (Di Pietro & Roncero, 1998). Las esporas se recogieron por filtración y posterior centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron muy bien con agua estéril desionizada y se calculó su concentración tras observarlas al microscopio con cámara de Thoma.

Las plantas de tomate se cultivaron en vermiculita hasta que presentaron sus primeras hojas verdaderas (15 días). Tras retirarlas cuidadosamente de la vermiculita se lavaron debajo del grifo suavemente. Seguidamente se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión acuosa con  $5 \times 10^6$  esporas/mL, en placas de Petri. A continuación las plantas se trasplantaron a minimacetos individuales con vermiculita y se cultivaron en cámara de cultivo con tubos fluorescente (36W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a 28°C.

La evolución de la enfermedad se evaluó durante las semanas siguientes a la infección. Para ello se utilizaron los índices de enfermedad descritos por Huertas-González *et al.* (1999) que se corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y peciolo caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido; 5, planta muerta. La evolución de la enfermedad también se definió como el porcentaje de supervivencia de las plantas tras 30-40 días usando el método Kaplan-Meier, analizando los datos con el programa *GraphPad Prism*, tal y como ha sido descrito por López-Berges *et al.* (2012).



Figura 11. Distintos estadios de la fusariosis vascular en plantas de tomate.

### 2.6.2. Infección de frutos

Se estudió el crecimiento invasivo del hongo mediante su inoculación en frutos de tomate de la variedad Daniela (Di Pietro *et al.*, 2001). Los frutos de tomates se lavaron bien con agua, se sumergieron durante 5 minutos en 96% de etanol (v/v) y se dejaron secar en el interior de una cámara de flujo laminar. Se inocularon 5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas a una concentración de  $10^7$  esporas/mL pinchando la superficie del fruto con la punta de una pipeta automática. Los tomates se incubaron a 28°C con una humedad relativa del 100%. El proceso de infección se evaluó a lo largo de 4 días.



## **2.7. Ensayos fenotípicos**

### **2.7.1. Ensayo de adhesión a raíces (Di Pietro et al, 2001)**

Las plantas de tomate se cultivaron en vermiculita hasta que presentaron sus primeras hojas verdaderas. Tras retirarlas cuidadosamente de la vermiculita se lavaron las raíces debajo del grifo con mucha suavidad. Posteriormente, cada planta fue sumergida en 50 mL de una suspensión con  $5 \times 10^6$  esporas/mL de PDB diluido 50 veces en agua estéril y suplementado con ácido glutámico a una concentración final de 20 mM, y se incubó durante 24-48 horas a 28°C y agitación (170 rpm); para ello se usaron matraces de 125 mL fijando la parte superior de la planta a la boca del matraz con cinta adhesiva.

Pasado el tiempo de incubación, se sacaron las raíces de las suspensiones, se lavaron vigorosamente en agua y se observaron bajo la lupa. El micelio adherido se observa como una masa blanca que recubre las raíces laterales.

### **2.7.2. Ensayo de producción de poligalacturonasas extracelulares (Di Pietro & Roncero, 1998)**

Se inocularon placas PGA (ver 1.3.2) tamponadas a pH 6,5, con 2  $\mu$ L de una suspensión de esporas a una concentración de  $10^7$  esporas/mL y se incubaron a 28°C durante 4 días. Pasado el tiempo se vertieron 20 mL de HCl 0,4 N sobre la placa y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se retiró la solución anterior y la placa se aclaró con agua del grifo. El tratamiento con HCl hace precipitar al ácido poligalacturónico quedando toda la placa de color blanco, salvo en aquellas zonas, alrededor de la colonia fúngica, en las que el polímero ha sido degradado por la acción de las poligalacturonasas extracelulares del hongo y se aprecia un halo transparente.

### **2.7.3. Ensayo de penetración de membranas de celofán (Prados Rosales & Di Pietro, 2008)**

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

Se prepararon placas de medio mínimo Puhalla con membranas de celofán (ver 1.3.2) y se inoculó el centro de cada una con una gota de 5  $\mu$ l de una suspensión de esporas a una concentración de  $10^7$  esporas/mL. Las placas se incubaron a 28°C durante 4 días; pasado este tiempo se retiró la membrana de celofán junto con la colonia fúngica y

se incubó 24 horas más a 28°C. Tanto el crecimiento del hongo antes de retirar el celofán, como la penetración o no del mismo fueron documentados mediante el escaneo de las placas.

#### **2.7.4. Ensayo de aglutinación (Prados Rosales & Di Pietro, 2008)**

Se inocularon, en un tubo de 30 mL,  $5 \times 10^6$  esporas frescas en 2 mL de PDB diluido 50 veces en agua estéril y suplementado con ácido glutámico a una concentración final de 20 mM. La incubación se realizó durante 36 horas a 28°C con agitación.

Pasado este tiempo, el cultivo se agitó vigorosamente para disgregar las uniones débiles y se traspasó íntegramente a una placa multipocillo donde se observó la presencia de agregados aglutinados de hifas bajo la lupa.

### **2.8. Ensayos de fusión vegetativa (Prados Rosales & Di Pietro, 2008)**

#### **2.8.1. Selección de mutantes *nit<sup>-</sup>* en medio con clorato**

Los mutantes *nit1* (nitrato reductasa), *nitM* (cofactor de molibdeno) y *nit2* (nitrito reductasa) son incapaces de metabolizar el clorato por lo que cepas afectadas en cualquiera de estos genes son resistentes a clorato (Cove, 1976; Puhalla, 1985).

Para seleccionar mutantes *nit<sup>-</sup>* de las cepas de *F. oxysporum* deseadas, se extendieron 100 µL de una suspensión de esporas frescas a una concentración de  $2,5 \times 10^7$  esporas/mL en una placa de PDA+clorato (15 g/L de  $\text{KClO}_3$ ) y se incubó a 28°C durante 10-15 días. Pasado este tiempo, las colonias resistentes a clorato que aparecieron se picaron a nuevas placas de PDA+clorato y se incubaron tres días más a 28°C. Una vez que la colonia estaba lo suficientemente crecida se cortó un trozo de la misma con una espátula estéril, y se inoculó en PDB. El cultivo se mantuvo 4 días en agitación a 28°C. Posteriormente se recogieron las esporas y se guardaron a -80°C con glicerol al 30% (v/v).

#### **Caracterización del fenotipo *nit<sup>-</sup>* de los mutantes obtenidos**

Cada uno de los mutantes resistentes a clorato obtenidos se sembró en placas de medio mínimo Puhalla (ver 1.3.2) con distintas fuentes de nitrógeno (23 mM de nitrato, 10 mM de nitrito, 0,7 mM de hipoxantina ó 5 mM de amonio) para poder caracterizar el tipo de mutación *nit<sup>-</sup>* que presentaba. En la siguiente tabla se representan los fenotipos asociados a las diferentes mutaciones según el crecimiento en las distintas fuentes de nitrógeno.

**Tabla 14. Fenotipo de los mutantes *nit* en medio mínimo Puhalla con diferentes fuentes de nitrógeno**

Mutante\Medio	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	Hipoxantina	NH <sub>4</sub>	Clorato
nit1 <sup>-</sup>	-	+	+	+	+
nit2 <sup>-</sup>	-	-	+	+	+
nitM	-	+	-	+	+
4287	+	+	+	+	-

El signo (-) indica un crecimiento donde el micelio que se forma es muy fino comparado con el de la cepa silvestre en los medios con fuente de nitrógeno. En el medio con clorato indica que la cepa silvestre no crece. El signo (+) indica crecimiento normal.

### 2.8.2. Ensayo cualitativo de fusión vegetativa

Se inocularon 5 µL de una suspensión de esporas del mutante *nit1* y del mutante *nitM* en placas de medio mínimo Puhalla (ver 1.3.2). Ambas gotas se colocaron a una distancia de aproximadamente 1 cm. La placa se incubó a 28°C durante 5 días y se observó si en la zona de contacto se produce el crecimiento vigoroso debido a la complementación genética que se deriva de la capacidad de fusión vegetativa de la colonia.

### 2.8.3. Ensayo cuantitativo de fusión vegetativa

Mediante este ensayo es posible cuantificar la frecuencia de fusión vegetativa de una cepa. Para llevarlo a cabo se necesitan dos mutantes distintos en los genes *nit* (*nit1* y *nitM*) para cada cepa a ensayar. Por tanto, el primer paso fue aislar mutantes *nit* (ver 2.8.1).

Las cepas a ensayar se crecieron en PDB a 28°C y agitación (170 rpm) durante 3 días. Se inoculó también una cepa *nit1* y otra *nitM* obtenidas en un fondo silvestre ya que éstas se utilizarán como control positivo de fusión. Para cuantificar la frecuencia de fusión de un mutante *nit1*, la cepa estándar es la *nitM*, y viceversa.

Las esporas se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en agua y se contabilizaron en cámara de Thoma. Se prepararon diluciones seriadas de todas las cepas a ensayar desde 10<sup>7</sup> esporas/mL hasta 10<sup>3</sup> esporas/mL. En un tubo de microcentrífuga se mezclaron 100 µL de la suspensión más concentrada de una cepa control (*nit1* o *nitM*), con 100 µL de cada una de las diluciones del mutante. Para el control positivo, se mezclaron 100 µL de la suspensión de esporas más concentrada del mutante *nitM* con 100 µL de la suspensión de esporas más diluida de mutante *nit1* y viceversa. Las

suspensiones de esporas se sembraron en placas de medio mínimo Puhalla (ver 1.3.2) se incubaron 4 días a 28°C y se contabilizó el número de colonias con crecimiento silvestre.

Para evaluar la viabilidad de cada cepa se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^3$  y  $10^4$  esporas/mL en placas de PDA. La frecuencia de reversión de la mutación *nit<sup>-</sup>* se evaluó sembrando 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^7$  esporas/mL en placas de medio mínimo Puhalla. La frecuencia de fusión de capa cepa se corrigió por el valor medio de supervivencia y de reversión de cada cepa. El resultado se expresó en relación a la frecuencia de fusión de la cepa silvestre.

## 2.9. Manipulación y análisis de proteínas

### 2.9.1. Extracción de proteínas totales

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de micelio se aplicó el método basado en lisis celular mecánica, separación, eliminación de restos celulares por centrifugación y precipitación de las proteínas solubles, según sea el destino de dichas proteínas.

Para la rotura celular, aproximadamente 100 mg de micelio, se machacó con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado hasta conseguir un fino polvo. El micelio machacado se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción A<sup>(1)</sup> frío, se homogeneizó vigorosamente y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó 10 minutos a 4°C y 13.000 rpm, recuperando el sobrenadante que se guardó a - 80°C hasta su uso. En el caso de proteínas utilizadas para análisis de fosforilación, el micelio machacado fue homogeneizado en tampón A incluyendo los siguientes inhibidores de fosfatasa: 50 mM NaF, 5 mM pirofosfato de sodio, 50 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1mM ortovanadato de sodio y una pastilla de un coctel de inhibidor de fosfatasa, *PhosSTOP Phosphatase* de Roche.

<sup>(1)</sup> **Tampón de extracción A:** 10% glicerol (v/v); 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 1% Triton; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF y 1% coctel inhibidor de proteasas (Sigma, P8215).

### 2.9.2. Concentración de proteínas con metanol-cloroformo (Wessel & Flugge, 1984)

Este paso de concentración de las proteínas se aplicó únicamente a aquellos extractos proteicos (procedentes de germínulas que habían sido inducidas 8 horas en placas de medio mínimo Puhalla) cuyo destino sería la espectrometría de masas.

Las proteínas extraídas se alicuotaron en volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  para, a continuación, añadir 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua destilada, agitando vigorosamente tras cada adición. Se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm y se desechó la fase superior con mucho cuidado de no extraer el anillo blanquecino formado por las proteínas en la interfase. De nuevo se añadieron 3 volúmenes de metanol, se homogeneizó y se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm eliminando el sobrenadante. El precipitado se secó y finalmente se resuspendió en tampón de hidratación 1X CHAPS<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>**Tampón de hidratación 1X CHAPS:** 7M urea; 2 M tiourea; 4% CHAPS ([3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]] (p/v).

### 2.9.3. Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método Bradford (1976) para cuantificar las proteínas utilizadas para la espectrometría de masas, utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Este método se basa en la reacción colorimétrica entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (Brilliant blue G-250) con grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de las proteínas (arginina, lisina e histidina). Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente, la cual se calcula utilizando una recta patrón.

Para la elaboración de esta recta se utilizó una disolución de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida (2 mg/mL) a partir de cual se hicieron diluciones seriadas. La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad) tanto a las soluciones de BSA como a las muestras problema. Tras 15 minutos de incubación en oscuridad se determinó la absorbancia a 595nm.

Para el resto de extractos proteicos, la concentración de proteínas se determinó usando el kit de Bio-Rad DC™ *protein assay* y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para la recta patrón también se usó la seroalbúmina bovina.

### 2.9.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis*) (Laemmli, 1970). Esta técnica permite la separación de las proteínas en función de su tamaño.

## Preparación de las muestras

Las muestras a analizar se mezclaron con tampón de carga para proteínas<sup>(1)</sup>, se desnaturalizaron 10 minutos a 100°C, se centrifugaron 2 min a 12.000 rpm y se cargaron en el gel SDS-PAGE.

<sup>(1)</sup>**Tampón de carga para proteínas:** 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 8% glicerol (v/v); 1,6% SDS (p/v); 4% β-mercaptoetanol (v/v); 0,1% azul de bromofenol.

## Preparación del gel

**1.- Gel separador (8 mL):** se mezclaron 2 mL de solución LGB<sup>(1)</sup> con 2,8 mL de 40% Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1, y agua desionizada. La polimerización se inició al añadir 40 µL de 10% persulfato de amonio (APS) v/v y 10 µL de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina). Tras verter la mezcla entre los dos cristales, se añadió suavemente agua hasta el borde. Una vez que el gel separador polimerizó, se retiró el agua invirtiendo el gel.

**2.- Gel concentrador (5mL):** se mezclaron 1,25 mL de solución UGB<sup>(2)</sup> con 0,5 mL de 40% Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 y 3 mL de agua desionizada. La polimerización se inició tras la adición de 30 µL de 10% APS (v/v) y 10 µL de Temed. Esta mezcla se añadió lentamente entre los cristales que ya tenían el gel separador. Se colocó el peine y se dejó polimerizar.

<sup>(1)</sup>**LGB (Lower Gel Buffer):** 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS.

<sup>(2)</sup>**UGB (Upper Gel Buffer):** 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS.

## Electroforesis

La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina<sup>(1)</sup> a un voltaje de 80V durante 45 minutos y 180V durante 90 minutos más, en el sistema vertical *mini Protean® cell* de Bio-Rad. Como patrón de peso molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas (*ProSieve® Quad Color*).

<sup>(1)</sup>**Tampón Tris-Glicina:** 25 mM Tris (Trizma base); 192 mM glicina; 0,1% SDS (p/v); pH 8,3.

## Tinción de los geles

**1.- Tinción de Coomassie:** los geles se tiñeron con solución de Coomassie<sup>(1)</sup>. Para eliminar el exceso de tinción se lavaron 30 minutos con solución *High Destain*<sup>(2)</sup> y durante 1 hora con la solución *Low Destain*<sup>(3)</sup>.

<sup>(1)</sup>**Solución de Coomassie:** 0,1% Coomassie Blue (brilliant blue R-250) (p/v); 60% metanol (v/v); 10% ácido acético (v/v).

<sup>(2)</sup>**Solución High Destain:** 50% metanol; 10% ácido acético.

<sup>(3)</sup>**Solución Low Destain:** 5% metanol; 7% ácido acético.

**2.- Tinción fluorescente SYPRO Ruby (BioRad):** Esta tinción se usó para la identificación posterior de proteínas por espectrometría de masas, al ser compatible con esta técnica.

Las proteínas se fijaron durante 30 minutos con una solución de fijación<sup>(1)</sup> y posteriormente se incubaron 12 horas en *SYPRO Ruby*. Finalmente, se lavaron 30 minutos con solución de fijación para eliminar la fluorescencia del fondo.

<sup>(1)</sup>**Solución de fijación:** 7% ácido acético; 10% metanol.

## 2.9.5. Análisis de la expresión diferencial de proteínas totales mediante espectrometría de masas

### Obtención de las muestras

Se inocularon  $5 \times 10^8$  esporas frescas de las distintas estirpes a ensayar en 50 mL de PDB y se dejaron germinar. Tras 12 horas de incubación a 28°C y 170 rpm, se recogieron las germínulas y se lavaron en agua estéril varias veces para eliminar los restos de PDB. A continuación, se resuspendieron en 4 mL de agua estéril transfiriéndose a dos placas de medio mínimo Puhalla e incubándose a 28°C durante 8 horas. Este proceso se repitió varias veces para obtener la cantidad de proteínas suficientes para el diseño experimental planteado.

### Diseño experimental

El análisis se llevó a cabo a partir de seis réplicas analíticas tanto de la estirpe silvestre 4287 como de la estirpe mutante  $\Delta fbp1$ . Para el análisis de las proteínas se prepararon mezclas aleatorias de los distintos extractos proteicos obtenidos bajo las condiciones de inducción indicadas en el párrafo anterior. Para cada réplica se utilizaron 150  $\mu\text{g}$  de proteínas.

## Electroforesis bidimensional

Esta técnica se utilizó para separar las muestras de proteínas totales de acuerdo al método descrito por Pitarch *et al.* (1999). El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en el equipo *Protean IEF cell* (Bio-Rad), utilizando tiras de gel de poliacrilamida de 17 cm con un gradiente lineal de pH inmovilizado (IPG) entre 5-8 (*ReadyStrips IPG Strips*, BioRad) (Bjellqvist *et al.*, 1993).

Cada muestra se resuspendió en tampón de carga<sup>(1)</sup> y agua hasta un volumen final de 350 µL y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se depositó sobre la tira de IPG, previamente hidratada con tampón de hidratación<sup>(2)</sup>. La electroforesis se realizó en una cámara de IEF a 20°C, aplicando los siguientes programas:

- Rehidratación pasiva, sin voltaje, durante 2 horas.
- Rehidratación activa 10 horas a 50 V.
- 1 hora a 1.000 V.
- 1 hora a 4.000 V.
- 30 minutos a 80.000 V.
- 80.000 V hasta alcanzar los 50.000V/hora.

Después de la primera dimensión, se realizó el equilibrado de las tiras con el fin de solubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro. Este proceso se realizó tratando las tiras con dos tampones de equilibrado<sup>(3)</sup> de manera secuencial e incubando 15 minutos con cada uno. A continuación, las tiras equilibradas se colocaron en la parte superior de un gel SDS-PAGE al 11% de acrilamida y se sellaron con una solución de agarosa al 0,5%. La segunda dimensión se llevó a cabo en un sistema de electroforesis vertical *Protean Plus Dodeca cell* (BioRad) a una intensidad de 30 V durante 30 minutos a 8°C y 60V hasta que el frente alcanzó el final del gel.

<sup>(1)</sup>**Tampón de carga:** Tampón de rehidratación con 2,8 mg/mL DTT fresco.

<sup>(2)</sup>**Tampón de rehidratación:** Urea 7 M; Tiourea 2 M; CHAPS 4%; DTT 20 mM; Tritón X-100 0,5%; Anfolitos 0,5%; Azul de bromofenol.

<sup>(3)</sup>**Tampón de equilibrado 1:** 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Urea; 2% SDS; 20% Glicerol; 2% DTT.

<sup>(3)</sup>**Tampón de equilibrado 2:** 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Urea; 2% SDS; 20% Glicerol; 2% DTT; 2,5% iodoacetamida.



### Escaneo de los geles

Las proteínas se visualizaron mediante el escaneado de los geles, previamente teñidos con *SYPRO-Ruby* (Bio-Rad) (ver 2.9.4). La digitalización de las imágenes se realizó en el equipo *Molecular Imager FX Pro Plus Multi-Imager System* (Bio-Rad) usando una longitud de onda de 535 nm y una resolución de 100  $\mu\text{m}$ .

### Análisis de imágenes para evaluar la expresión diferencial

Las imágenes obtenidas de los geles se analizaron con el programa *PD-Quest*. La normalización entre geles se basó en la cantidad total de proteína aplicada al gel ("*Total quantity in valid spots*"). El criterio de selección cuantitativo para determinar la presencia/ausencia de los spots proteicos entre réplicas fue de  $V > 2$  o  $V < 0,5$ , siendo V el volumen normalizado del spot en unidades de ppm CNT (unidades de cuantificación).

El análisis estadístico de los spots con expresión diferencial se hizo mediante el test "*t de Student*" para determinar la probabilidad de que éstas se debieran al azar. Previamente se comprobó la normalidad de la distribución (test de *Wilks-Shapiro*), y la igualdad ó no de varianzas (test *F-Snedecor*). Aquellos spots con un *p-Value*  $< 0,05$  se consideraron proteínas con expresión diferencial en las estirpes analizadas.

### Escisión y digestión de las manchas proteicas

Las proteínas de interés fueron escindidas del gel mediante la estación automática *Investigator™ ProPic* (Genomic Solution), y sometidas a digestión triptica según el protocolo de Schevchenko *et al.* (1996) con pequeñas modificaciones, en el digestor *ProPrep II* (Genomic Solutions) siguiendo los pasos que se indican:

- Lavado con 25 mM bicarbonato amónico y acetonitrilo.
- Reducción con 10 mM ditioneol en 25 mM bicarbonato amónico.
- Alquilación con 100 mM iodoacetamida en 50 mM bicarbonato amónico.
- Eliminación de residuos del gel con 50 mM bicarbonato amónico y acetonitrilo, y secado bajo nitrógeno gaseoso.
- Tratamiento con 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina porcina (Promega, Madison WI) en 25 mM bicarbonato amónico durante 12 horas a 37°C.
- Elución de los péptidos resultantes con 25 mM bicarbonato amónico y 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) (v/v) en 50  $\mu\text{L}$  de volumen final.

-Purificación y concentración en microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), y elución directa en una solución de matriz<sup>(1)</sup> sobre la placa MALDI en un volumen de 1  $\mu$ L.

<sup>(1)</sup>**Solución matriz:** 3 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidoxicinámico en 70% acetonitrilo/0,1% TFA.

### **Espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF)**

Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight*) en un espectrómetro de masas 4800 *Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems). La adquisición de los espectros se realizó en modo reflector de forma manual. Después de llevar a cabo una autocalibración utilizando las relaciones masa/carga de los picos de autólisis de la tripsina porcina ( $M+H^+=842,509$ ,  $M+H^+=2211,104$ ), se determinó la huella peptídica (MS), utilizando los picos mayoritarios en un rango de masa entre 800-4000 m/z. De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MSMS) de las m/z más intensas.

La identificación de proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MSMS sobre la base de datos de *F. oxysporum* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html)), utilizando Mascot 2.0 (MatrixScience) como motor de búsqueda. Los siguientes parámetros fueron seleccionados para la búsqueda: restricción taxonómica a hongos, un mínimo de cuatro péptidos macheados, un número máximo de errores en el corte de la tripsina de uno y metioninas oxidadas como posibles modificaciones. Se consideraron válidos aquellos análisis que tuvieron un nivel de puntuación (*score*) mínimo de 55 y se confirmaron por la superposición exacta de los péptidos macheados en los principales picos del espectro.

#### **2.9.6. Análisis Western Blot**

Para los análisis de hibridación *Western blot* se emplearon 100  $\mu$ g de proteínas totales resuspendidas en tampón de carga (ver 2.9.4) y separadas en geles de poliacrilamida al 12% siguiendo las condiciones de electroforesis indicadas en el apartado 2.9.4.

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando el *Mini Trans-blot® Cell* (Bio-Rad) y tampón de transferencia<sup>(1)</sup> a 100V durante 2 horas a 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de *skin milk* disuelto en TBST<sup>(2)</sup> pH 7,6 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Antes de incubar con el anticuerpo primario la membrana se lavó varias veces con TBST pH 7,6 para eliminar el exceso de *skin milk*. El anticuerpo primario se mantuvo a 4°C durante toda la noche, mientras que el secundario se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los residuos fosforilados p44/42 de las MAP kinasas Fmk1 y Mpk1 se detectaron usando el anticuerpo primario PhosphoPlus p42/p44 MAP kinase (Thr-202/Tyr-204) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la detección de las proteínas kinasas Fmk1 y Mpk1 se usaron los anticuerpos  $\alpha$ -FUS3 y  $\alpha$ -Mpk1, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de Bmh2 se usó el anticuerpo  $\alpha$ -BMH2. Como control de carga se usó el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -tubulina.

<sup>(1)</sup>**Tampón de transferencia:** 48 mM Tris-HCl pH 7,5; 39 mM glicina; 0,0375% SDS y 20% metanol.

<sup>(2)</sup>**TBST:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% de Tween 20. Ajustar el pH a 7,6 con HCl.

## 2.10. Microscopía

Para la observación microscópica de las distintas estirpes de *F. oxysporum* empleadas en este trabajo se inocularon  $10^7$  esporas/mL de cada estirpe y se incubaron 36 horas a 28°C en el medio sólido correspondiente con un 3% de agarosa.

La observación del crecimiento de las hifas líder de la colonia se realizó en microscopio óptico. Para una observación a nivel microscópico, se cortó un fragmento del borde de la colonia, se le añadieron 10  $\mu$ L de medio mínimo líquido y se cubrió con un cubreobjetos. Las muestras se observaron empleando la técnica Nomarsky con un objetivo de 20x y 40X, en un microscopio Leica DMR. En el caso de una observación a nivel macroscópico, se tomó directamente la placa en la que crecía la colonia y se observó bajo un estereomicroscopio Zeiss.

Para los análisis de fluorescencia, un corte del borde de la colonia se tiñó con 20  $\mu$ L de medio mínimo líquido que contenía FM4-64 a 4,5  $\mu$ M. Las muestras se mantuvieron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad antes de su visualización con el objetivo 40X en un microscopio Leica DMR.

## 2.11. Análisis bioinformáticos

### 2.11.1. Búsquedas mediante BLAST

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

### 2.11.2. Alineamientos, dominios, modelado estructural y funciones proteicas

Las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas de *F. oxysporum* y de otras especies fúngicas cercanas fueron alineadas con la herramienta *M-Coffee* (Di Tommaso et al, 2011; Moretti et al, 2007; Notredame et al, 2000; Wallace et al, 2006) y fueron visualizadas, ajustadas y corregidas manualmente con el programa *Vector NTI® AlignX* (Invitrogen).

Las predicciones de los dominios de las proteínas Fbp1 y sus ortólogos se realizaron usando la base de datos *Prosite* (ExPASy; Instituto suizo de bioinformática) y *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/>) y el análisis *SMART* (Simple Modular Architecture Research Tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>). La identificación de dominios PEST en las distintas proteínas se realizó utilizando el algoritmo *epestfind* (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/epestfind>) (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al, 1986). El análisis de elementos de secuencia de las proteínas 14-3-3 se llevó a cabo mediante la herramienta *PSIPRED* (Jones, 1999) disponible en el servidor *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold et al, 2006).

La construcción de un modelo de la estructura 3D de las proteínas Bmh1, Bmh2 y Bmh2<sub>210-276</sub> de *F. oxysporum* se llevó a cabo utilizando la herramienta *Swiss-Model Workspace* (Arnold et al, 2006). Para ello, se empleó como modelo la estructura 3D de la proteína 14-3-3 subunidad epsilon de *Homo sapiens* (código de acceso del *Protein Data Bank*: 2br9.A (Yang et al, 2006)). Las figuras estructurales se prepararon con el programa *Vector NTI®3D Molecule Viewer* (Invitrogen).

La asignación de una categoría funcional para las proteínas identificadas, y en función del proceso biológico del que forman parte, se realizó usando en el *gene ontology* (GO) y la información de la base de datos *UniProt-GO* (<http://www.ebi.ac.uk/GOA/>).

### 2.11.3. Árboles filogenéticos

La elaboración del árbol filogenético se llevó a cabo a través de la plataforma *Phylogeny.fr* (<http://www.phylogeny.fr>) donde es posible seleccionar cada una de las herramientas previas hasta la obtención del mismo (Dereeper et al, 2010; Dereeper et al, 2008). El alineamiento de las secuencias se realizó usando la herramienta *T-Coffee* (Notredame et al, 2000). Los alineamientos fueron desprovistos de los huecos existentes mediante el programa *GBlocks v0.91b* (Castresana, 2000). A continuación, aplicando el programa *PHYLM v3.0* (Anisimova & Gascuel, 2006; Guindon & Gascuel, 2003) se realizó un análisis filogenético por el método de máxima probabilidad con un *bootstrap* no paramétrico de 500 repeticiones a partir del alineamiento resultante. La representación gráfica y edición del árbol se llevó a cabo mediante la herramienta *TreeDyn v198.3* (Chevenet et al, 2006).

**Resultados**



## 1. Fbp1, una proteína F-box conservada en hongos

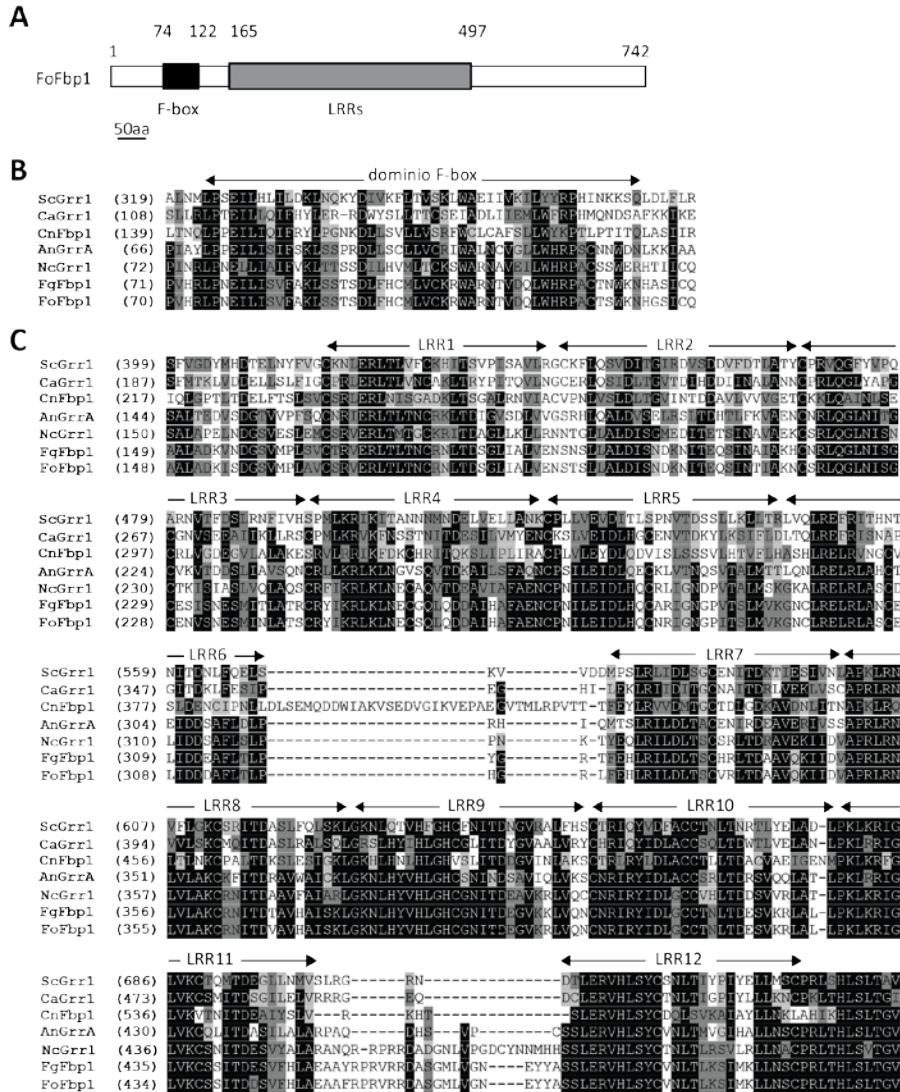
Un regulador importante de los procesos fisiológicos en eucariotas es la renovación proteica. Dada la importancia de dicho proceso, resultó de gran interés investigar el papel de proteínas pertenecientes a la maquinaria de renovación proteica, en la patogénesis de *Fusarium*.

Aunque en humanos y en levaduras se han identificado muchas proteínas F-box responsables del secuestro de las proteínas diana, para su ubiquitinación y posterior degradación por proteosoma, en hongos filamentosos se conoce muy poco al respecto. Sin embargo, recientemente se han identificado en *Fusarium* dos proteínas F-box del complejo SCF implicadas en la patogénesis, Frp1 en *Fusarium oxysporum* (Duyvesteijn et al, 2005) y FBP1 en *Fusarium graminearum* (Han et al, 2007).

### 1.1. Identificación, análisis y expresión del gen *fbp1* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

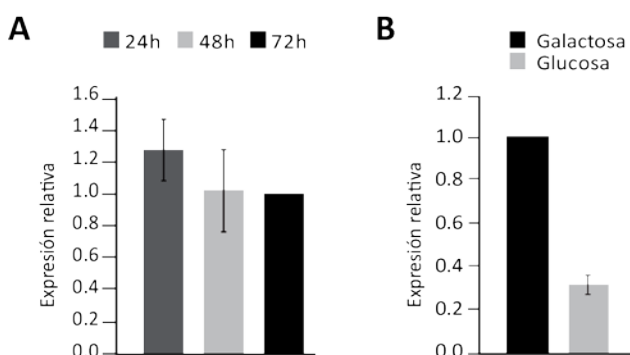
La búsqueda de proteínas con dominio F-box en el genoma de *Fusarium* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/)) reveló la presencia de 53 proteínas F-box en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* así como 63 y 42 proteínas F-box en los genomas de *F. graminearum* y *Fusarium verticilloides*, respectivamente. De entre ellas, la proteína codificada por el gen FOXG\_04438 es la ortóloga a Fbp1 en *F. graminearum* (Han et al, 2007). La proteína deducida contiene 743 aa y su secuencia génica se encuentra interrumpida por tres intrones. Al igual que GRR1, en levaduras, y los ortólogos de otras especies fúngicas, Fbp1 contiene un dominio F-box y doce copias en tándem de una secuencia de 26 aminoácidos, que se corresponde con el dominio LRR (figura 12). La secuencia de Fbp1 presentó una alta similitud (87% de identidad) con la proteína Fbp1 de *F. graminearum*. Estos niveles de identidad se incrementaron hasta casi el 99% cuando se compararon los dominios conservados F-box o LRR. Un análisis de dominios PEST con la herramienta *Emboss epestfind* (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/epestfind>) reveló que Fbp1 contiene un potencial dominio PEST localizado entre las posiciones 12 y 23, responsable de su posible autorregulación por degradación proteolítica.





**Figura 12.** El producto génico de *fbp1* en *F. oxysporum* representa una proteína F-box conservada en hongos. (A) Ilustración esquemática de la proteína Fbp1 en *F. oxysporum*. F-box, dominio F-box; LRRs, repeticiones ricas en leucina; aa, aminoácidos. Se indican las posiciones de los aminoácidos en los límites de los dominios. (B) y (C) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las regiones que abarcan el dominio F-box (B) y el dominio LRR (C) en *Saccharomyces cerevisiae* (ScGrr1), *Candida albicans* (CaGrr1), *Cryptococcus neoformans* (CnFbp1), *Aspergillus nidulans* (AnGrrA), *Neurospora crassa* (NcGrr1), *Fusarium graminearum* (FgFbp1) y *Fusarium oxysporum* (FoFbp1). Las posiciones de los aminoácidos en la estructura primaria de las distintas proteínas se indican a la izquierda. Los residuos idénticos están sombreados en negro, los conservados en gris oscuro y los similares en gris claro.

El análisis de la expresión del gen *fbp1* se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se sintetizó ADNc a partir de ARN extraído de cultivos crecidos en medio rico (PDB) ó en medio mínimo MMP (Puhalla, 1968). Los niveles de transcrito del gen *fbp1* indicaron una expresión constitutiva en medio PDB en diferentes tiempos de crecimiento (figura 13A). Este resultado es coherente con el descrito previamente en *F. graminearum* (Han et al, 2007). Sin embargo, la expresión de *fbp1* se encuentra regulada por glucosa, observándose una menor expresión en glucosa que en galactosa, al igual que ocurre en los genes ortólogos descritos en levaduras y en hongos patógenos como *Cryptococcus neoformans* ó *F. graminearum* (figura 13B).



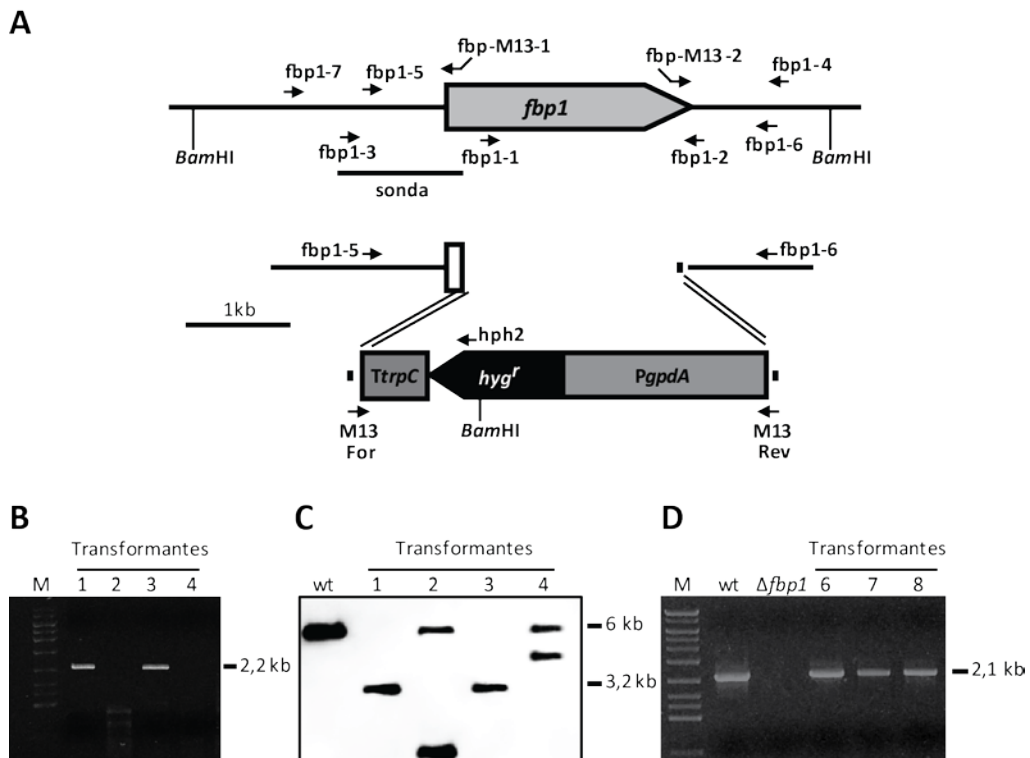
**Figura 13. Expresión de *fbp1* bajo distintas condiciones de crecimiento.** Los histogramas muestran la expresión relativa de *fbp1* medida por PCR a tiempo real (Q-RT-PCR). El ARN se aisló de micelio obtenido tras los tiempos de incubación indicados en medio PDB (A) o tras pregerminar 14 horas en PDB y transferir durante 6 horas más a un medio inductor (galactosa) o represor (glucosa) (B). Los datos fueron normalizados tomando como referencia el nivel de transcrito del gen *actina* y relativizados tomando como unidad los valores de expresión a 72 horas (A) o medio con galactosa (B).

## 1.2. Interrupción dirigida del gen *fbp1* (FOXG\_04438)

Con el fin de conocer el papel biológico de la proteína Fbp1 en *F. oxysporum* se construyeron mutantes  $\Delta fbp1$  mediante la transformación de protoplastos de la cepa silvestre con una construcción en la que se había reemplazado la fase abierta de lectura del gen (ORF) por el casete de resistencia a higromicina (figura 14A). El análisis mediante PCR, con cebadores específicos, de 4 de los transformantes resistentes a higromicina identificó a 2 de ellos como transformantes por integración homóloga (figura 14B). El análisis *Southern* confirmó la presencia de una sola copia del alelo mutado; la banda de hibridación *Bam*HI de 6,0 kb de la estirpe silvestre había sido

sustituida por otra de 3,2 kb (figura 14C) en los mutantes por recombinación homóloga.

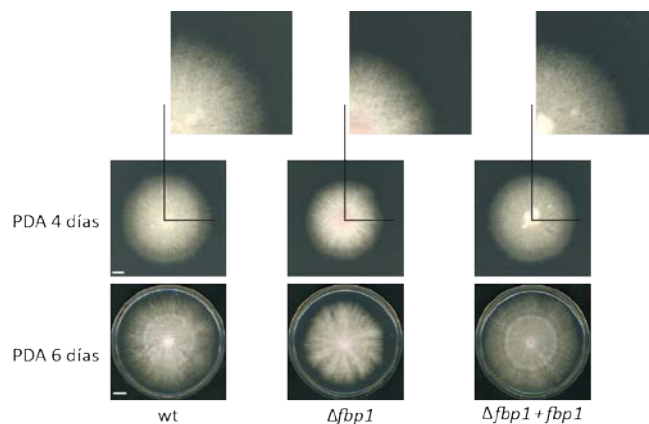
Para complementar la mutación  $\Delta fbp1$  se amplificó un fragmento de 5,0 kb (cebadores fbp1-4 + fbp1-7) que contenía el alelo silvestre del gen *fbp1*, y se utilizó para cotransformar protoplastos del mutante  $\Delta fbp1$  junto con el casete de resistencia a fleomicina. El análisis mediante PCR de 3 transformantes resistentes a fleomicina, reveló que todos ellos habían integrado una copia intacta del gen (figura 14D).



**Figura 14. Interrupción dirigida del gen *fbp1*.** (A) Representación esquemática del locus *fbp1* y del casete de interrupción con el marcador seleccionable obtenido por PCR de fusión. (B) Análisis de los transformantes mediante PCR con los cebadores específicos fbp1-3 (externo a la construcción en 5') y hph2 (higromicina). (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación *Southern*; ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con *Bam*HI, separado en un gel de 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada. (D) Análisis de tres complementados independientes mediante PCR usando cebadores específicos fbp1-1 y fbp1-2.

### 1.3. Fbp1 está implicada en el crecimiento direccional en medio sólido

El crecimiento de *F. oxysporum* sobre medio sólido desarrolla una colonia algodonosa y homogénea. La mutación en el gen *fbp1* dio lugar a una morfología de la colonia diferente, más evidente a los 6 días de crecimiento (figura 15).

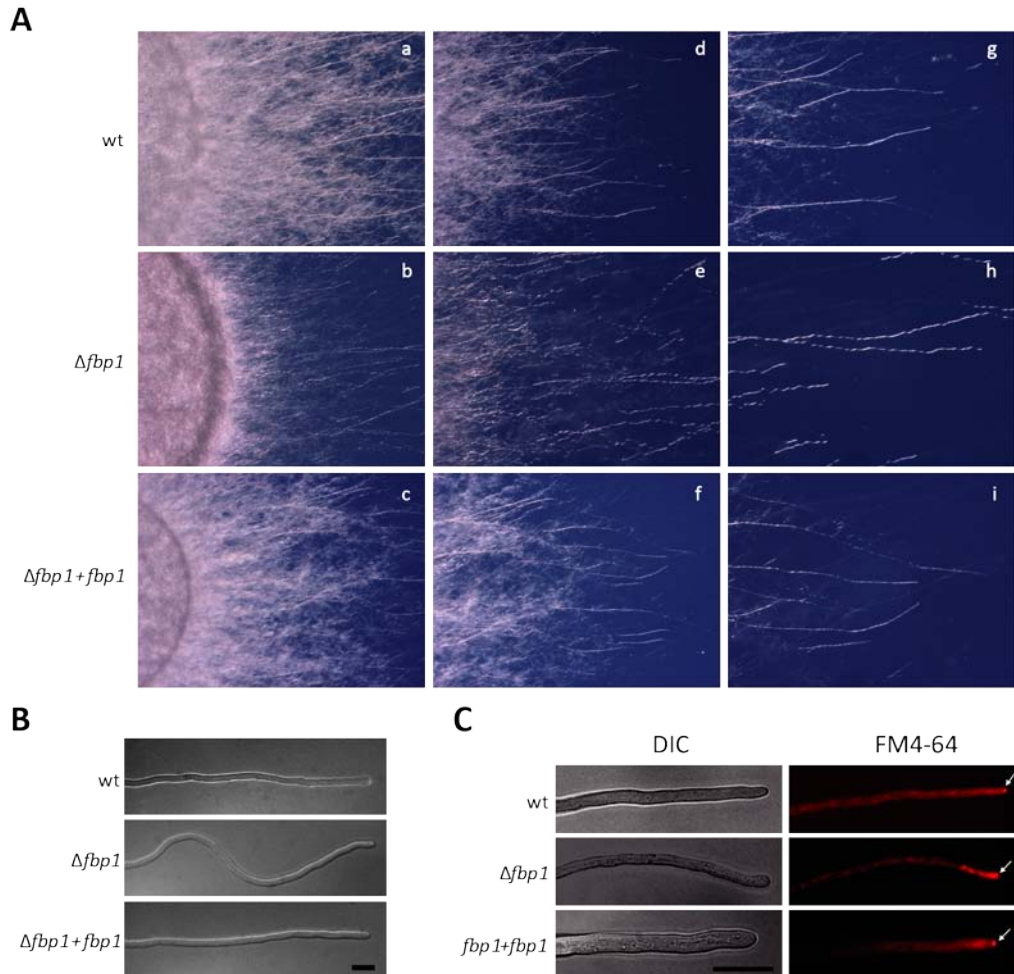


**Figura 15. Arquitectura de la colonia en medio sólido.** Esporas frescas de las distintas estirpes se crecieron 4 y 6 días a 28°C en medio rico PDA. Escala, 10 mm.

Para estudiar el papel de Fbp1 en la estructura de la colonia se analizó la morfología de las hifas líder (responsables del crecimiento polarizado) durante el desarrollo de la misma, comparando el patrón de crecimiento de estas hifas en las estirpes  $\Delta fbp1$  y silvestre. Las hifas del mutante presentaron un fenotipo de crecimiento ondulado frente a las hifas rectilíneas de las cepas silvestre y complementada (figuras 16A y 16B). Se cuantificó este fenotipo mediante el conteo del número de hifas líder onduladas en colonias independientes. Tras analizar 200 hifas líder en la cepa mutante se encontró un 100% de hifas onduladas, frente a la estirpe silvestre y complementada en la que todas las hifas observadas mostraron un fenotipo rectilíneo.

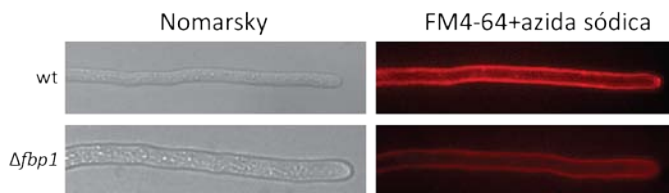
Una de las características de los hongos filamentosos es la presencia del Spitzenkörper (Spk), un centro de recepción de vesículas muy dinámico localizado en el ápice de la hifa y a partir del cual se genera el crecimiento polarizado (Harris et al, 2005). Para analizar el Spk en la hifas líder se utilizó la tinción con FM4-64, un colorante ampliamente usado en muchos hongos para visualizar este conjunto de vesículas (Fischer-Parton et al, 2000; Peñalva, 2005) Mientras que en las cepas

silvestre y complementada se observó un Spk bien definido en los ápices en crecimiento, el mutante presentó una tinción deslocalizada y muy abundante (figura 16C).



**Figura 16. Efecto de la delección de *fbp1* sobre el crecimiento direccional de las hifas.** (A)  $5 \times 10^4$  esporas frescas de las distintas cepas se crecieron en medio mínimo Puhalla con agarosa durante 48 horas a 28°C. Las imágenes, tomadas con un estereomicroscopio Zeiss, muestran el fenotipo de crecimiento del borde de la colonia fúngica (a-c, 15X, d-f, 28X, g-i, 80X). (B) las muestras del apartado A se observaron bajo un microscopio Leica DMR (40X) usando la técnica Nomarsky. Escala, 10  $\mu$ m. (C) las muestras del apartado A se tiñeron 15 minutos con el colorante FM4-64 a una concentración final de 4,5  $\mu$ M y se observaron con fluorescencia en un microscopio Leica DMR (40X). Las flechas blancas indican el Spk. Escala, 10  $\mu$ m.

Con el fin de comprobar si el aumento de tinción en el ápice de las hifas  $\Delta fbp1$  era debido a que el colorante entraba por difusión, se aplicó FM4-64 en presencia de azida sódica, un inhibidor metabólico (figura 17). Como se observa en la figura, la azida sódica inhibió la entrada del colorante pero permitió la tinción de la membrana plasmática de la zona apical, por lo que se concluyó que la incorporación del colorante era una incorporación activa.



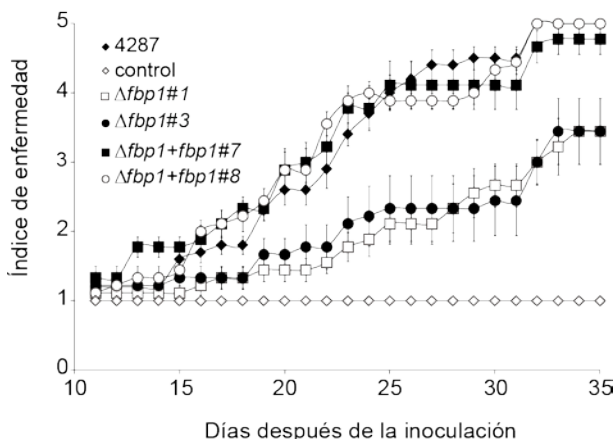
**Figura 17. Efecto de la azida sódica sobre la tinción con FM4-64.** Hifas líderes de la cepa silvestre y  $\Delta fbp1$  teñidas con FM4-64 durante 15 minutos en presencia de 300 mM de azida sódica (la azida se añade 2 minutos antes del colorante).

Estos resultados sugieren que Fbp1 está implicada en la correcta formación del Spk y en el crecimiento direccional de la colonia en medio sólido.

#### 1.4. Fbp1 contribuye a la virulencia de *F. oxysporum*

El papel de Fbp1 en la virulencia de *F. oxysporum* se estudió mediante infección de plantas de tomate del cultivar Monika. Para ello, raíces de plántulas de 14 días de edad fueron sumergidas en suspensiones de esporas frescas de las distintas cepas durante 30 minutos.

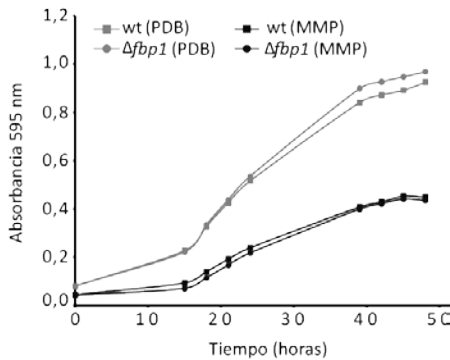
Las plantas se evaluaron según los síntomas de marchitez vascular aparecidos tras diferentes intervalos de tiempo (Huertas-Gonzalez et al, 1999). El desarrollo de la enfermedad se muestra en la figura 18. Los síntomas de enfermedad en las plantas inoculadas con la cepa silvestre se incrementaron durante el desarrollo del experimento, y la mayoría de ellas se encontraron en un grado de 4 a los 25 días. Por el contrario, las plantas inoculadas con la cepa  $\Delta fbp1$  mostraron un retraso significativo en el desarrollo de la marchitez, encontrándose en un grado de 2 a los 25 días. En los mutantes complementados, la virulencia se restableció a los niveles de la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que Fbp1 es esencial para el completo desarrollo de la enfermedad en plantas de tomate.



**Figura 18. Fbp1 es esencial para la completa virulencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate.** La gráfica muestra el desarrollo de la marchitez vascular provocada por las cepas indicadas de *Fusarium* sobre plantas de tomate (cv. Monika). La severidad de los síntomas se evaluó a diferentes tiempos tras la inoculación, utilizando un índice de 1 (planta sana) a 5 (planta muerta). Las barras de error representan las desviaciones estándar calculadas a partir de 10 plantas. El ensayo se llevó a cabo al menos tres veces con resultados similares.

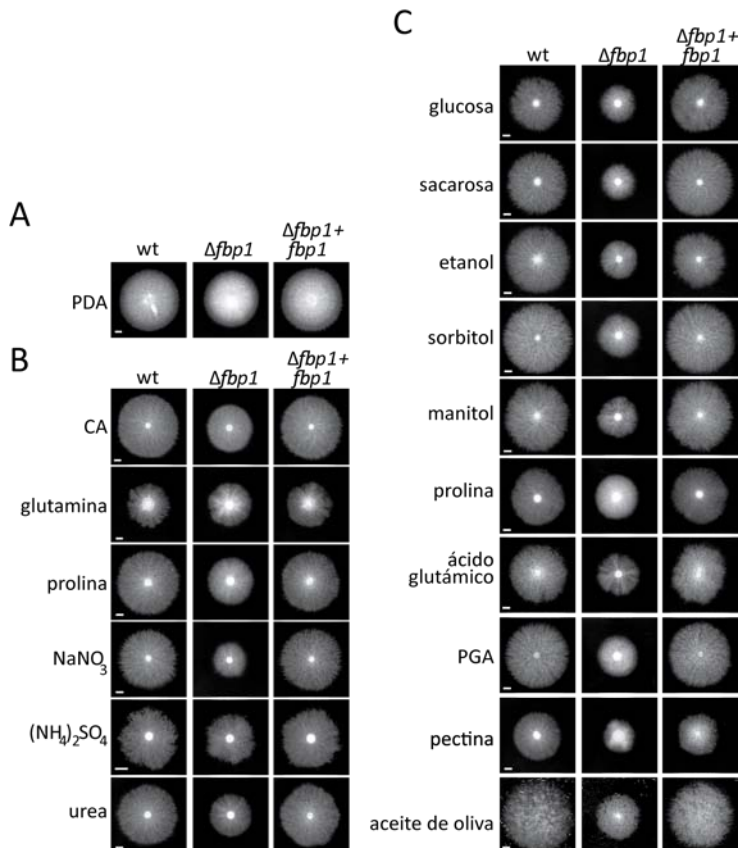
### 1.5. Fbp1 contribuye al crecimiento en medio sólido

Un aspecto que podría influir en el retraso en la virulencia de la estirpe  $\Delta fbp1$  podría ser que presentara una dificultad en la asimilación de nutrientes, teniendo en cuenta que GRR1 en *S. cerevisiae* está implicada tanto en la incorporación como la asimilación de nutrientes (Eckert-Boulet et al, 2005; Spielwoy et al, 2004; Spielwoy et al, 2010). Para investigar esta posibilidad se analizó el fenotipo de crecimiento de las distintas cepas en medio líquido PDB y MMP. Como se observa en la figura 19, la curva de crecimiento fue similar en las estirpes silvestre y mutante, tanto en PDB como en MMP. Se analizó asimismo el crecimiento en líquido de ambas estirpes en MM con diferentes fuentes de nitrógeno, observándose resultados similares (datos no mostrados).



**Figura 19. Crecimiento en medio líquido.** Esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron en medio rico (PDB) y medio mínimo puhalla midiendo la absorbancia de los cultivos a 595 nm a los tiempos indicados.

Sin embargo, al analizar el crecimiento en medio sólido, el mutante  $\Delta fbp1$  exhibió una reducción muy significativa en el radio de la colonia respecto de la cepa silvestre en todas las fuentes de nitrógeno y carbono testadas (figura 20B,C), siendo esa reducción menor en el medio nutritivo PDA (figura 20A).



**Figura 20. Efecto de la delección de *fbp1* en la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.**  $2 \times 10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron durante 4 días a 28°C en medio rico, PDA (A), 4 días a 28°C en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno al 1% (B) y 4 días a 28°C en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono al 1% (C). CA, casaminoácidos. Escala 5 mm.

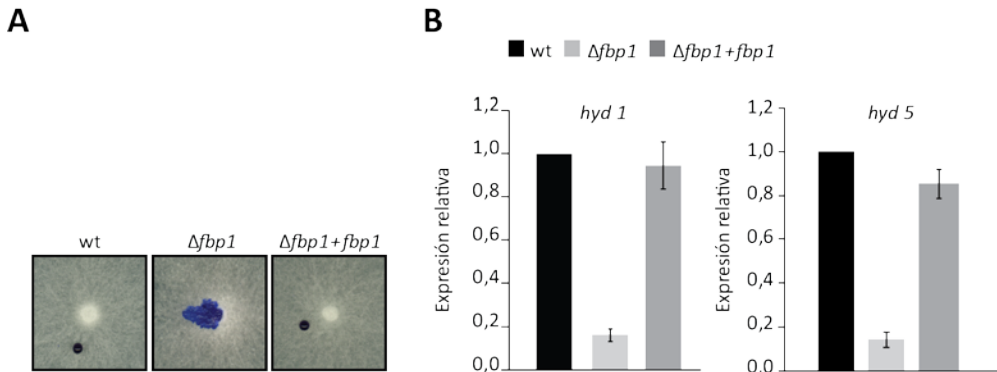


La disminución del crecimiento en medio sólido, en cualquiera de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas sugería que la mutación *fbp1* afectara a la desrepresión de cualquier ruta metabólica. Con el fin de comprobarlo se llevó a cabo un ensayo de crecimiento en alcohol alílico, cuyo derivado acroleína es tóxico para el hongo. En el caso de que  $\Delta fbp1$  estuviese afectado en desrepresión, sería más resistente al alcohol alílico que la estirpe silvestre. Sin embargo no se obtuvieron resultados concluyentes, por lo que se sugiere que el menor tamaño de la colonia en la cepa mutante sea debido a un defecto en el crecimiento direccional sumado a deficiencias en la asimilación de nutrientes. En *S. cerevisiae* el regulador de permeasas de aminoácidos Npr2 tiene una regulación por proteasoma, dirigido por GRR1 (Spielewoy et al, 2010). En el mismo sentido GRR1 es necesaria para la correcta expresión de permeasas de aminoácidos y para la correcta transcripción de genes del metabolismo del carbono (Eckert-Boulet et al, 2005).

### **1.6. La mutación $\Delta fbp1$ reduce la expresión de hidrofobinas disminuyendo la hidrofobicidad de la colonia.**

Dado que el micelio de *F. oxysporum* presenta una alta hidrofobicidad, se estudió el efecto de la mutación en *fbp1* sobre la misma. Para ello se colocaron gotas de agua teñidas sobre el micelio de las diferentes estirpes. Al cabo de 24 horas las gotas depositadas sobre la colonia silvestre se mantuvieron intactas, sugiriendo que la superficie es altamente hidrofóbica. Por el contrario, las gotas fueron absorbidas rápidamente en la colonia mutante. La estirpe complementada recuperó la hidrofobicidad de la colonia (figura 21A).

Para investigar más a fondo la regulación de la hidrofobicidad por Fbp1, se analizó la expresión de cuatro hidrofobinas presentes en el genomio de *F. oxysporum* (*hyd1*, *hyd3*, *hyd4* y *hyd5*) (Ruiz-Roldan et al, 2008). Mediante análisis de RT-PCR semicuantitativa (25 y 35 ciclos) se encontraron niveles de expresión similares, entre la cepa silvestre y la mutante, para dos de las hidrofobinas, *hyd3* e *hyd4* (datos no mostrados). Sin embargo, se observó una expresión reducida en el mutante  $\Delta fbp1$  para las hidrofobinas *hyd1* e *hyd5*. Para confirmar esta reducción en el nivel de expresión se llevó a cabo una qPCR. Los resultados indican un papel de Fbp1 en la regulación transcripcional de *hyd1* e *hyd5* (figura 21B) y en la hidrofobicidad de la colonia.



**Figura 21. Fbp1 contribuye a la hidrofobicidad de la colonia.** (A)  $2 \times 10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron en medio mínimo con un 3% de sacarosa y se incubaron a 28°C. Después de 6 días de crecimiento se depositó una gota de 20  $\mu$ L de agua teñida de azul sobre las colonias. La foto fue tomada justo inmediatamente tras colocar la gota. (B) Las cepas indicadas se pregerminaron 15 horas en PBD, las germinulas se lavaron en agua desionizada y se transfirieron a una placa de medio mínimo durante 8 horas. El análisis de la expresión se realizó por qPCR. Los histogramas muestran la expresión relativa de la hidrofobina 1 (*Hyd 1*) y la hidrofobina 5 (*Hyd 5*) en relación a la estirpe silvestre (wt). Los datos fueron normalizados tomando como referencia el nivel del transcrito del gen actina. Las barras de error estándar fueron calculadas a partir de 3 repeticiones técnicas y 3 réplicas biológicas independientes.

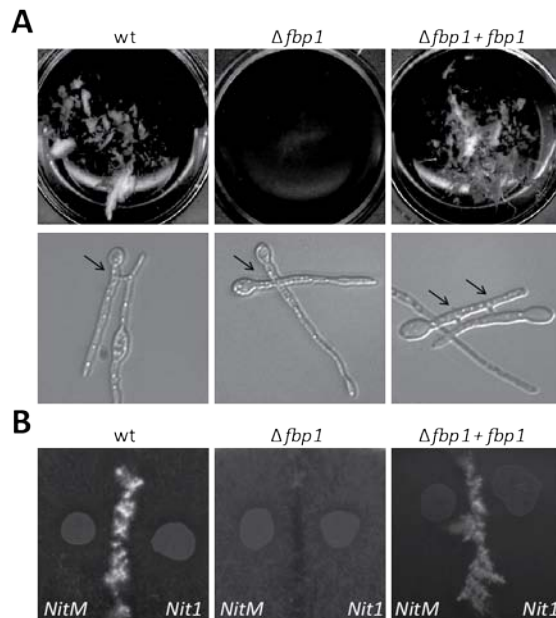
### 1.7. Fbp1 está implicada en la fusión de hifas, adhesión a raíz y crecimiento invasivo.

Para la formación de la colonia en medio sólido intervienen dos procesos importantes: (i) el crecimiento de las hifas individualmente por extensión del ápice y ramificación que requiere de la polaridad celular y (ii) el establecimiento de una red interconectada de hifas (micelio) mediante la fusión vegetativa de hifas o anastomosis.

Como se vió anteriormente la ausencia de Fbp1 origina un crecimiento sinuoso de las hifas y una reducción importante en el tamaño de las colonias. Para investigar si la mutación  $\Delta fbp1$  afectaba a la fusión vegetativa de las hifas se realizó un análisis a nivel macro y microscópico de la capacidad de fusión de hifas del mutante  $\Delta fbp1$ .

La fusión de hifas en cultivos líquidos de la estirpe silvestre se visualiza como la formación de redes de micelios interconectados entre sí en medio de aglutinación (Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Como se observa en la figura 22A panel superior, el mutante  $\Delta fbp1$  fue incapaz de fusionar las hifas, y por tanto de formar agregados, indicando que Fbp1 es esencial para la fusión vegetativa de hifas. Estos resultados se confirmaron a nivel microscópico observando eventos de fusión en esporas

germinadas de las distintas estirpes. Así, en la cepa silvestre se observó un gran número de sucesos de fusión que se mostraban en forma de pequeños puentes entre hifas que crecían paralelamente (figura 22A panel inferior), mientras que no se encontraron puentes de fusión en la cepa  $\Delta fbp1$ , aun cuando existía contacto físico entre las hifas. En ambos ensayos la estirpe complementada recuperó el fenotipo silvestre.



**Figura 22. Fbp1 regula la fusión vegetativa de hifas.** (A) las distintas cepas se crecieron en PDB diluido en agua 1:50 y suplementado con 20 mM de ácido glutámico. Panel superior: tras 36 horas en agitación a 28°C los agregados de las hifas se transfirieron a una placa de cultivo y se fotografiaron. Panel inferior: tras 12 horas de agitación a 28°C las germínulas se observaron en un microscopio Leica DMR (40X) usando la técnica Nomarsky. (B) Se obtuvieron mutantes *nit1* y *nitM* y se inocularon a una distancia de un centímetro el uno del otro en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno. El crecimiento vigoroso en la zona de contacto indica que se ha producido la complementación vegetativa gracias a la formación del heterocarion.

Para analizar en profundidad la reducción en la capacidad de fusión del mutante  $\Delta fbp1$  se realizaron ensayos cualitativos y cuantitativos de formación de heterocariontes. Para ello, se aislaron mutantes afectados en la utilización del nitrato (sobre los fondos genéticos silvestre,  $\Delta fbp1$  y complementado) mediante la selección en medio con clorato (ver materiales y métodos). La caracterización de los mutantes *nit*<sup>-</sup> permitió identificar mutantes *nit1* y *nitM* con los que se llevó a cabo el ensayo de fusión cualitativo como se describió en materiales y métodos. La figura 22B muestra el

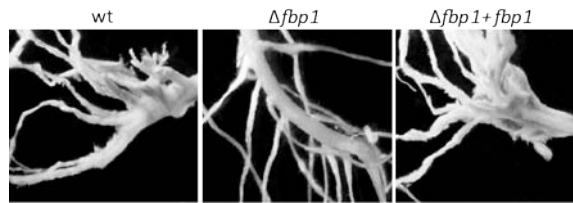
resultado de la fusión vegetativa entre mutantes *nit1* y *nitM* observándose un crecimiento normal en la zona de contacto de las colonias inoculadas tanto en la cepa silvestre como en la complementada, lo que indica complementación genética entre las dos cepas. Por el contrario, no se observó crecimiento en los mutantes *nit1* y *nitM* en fondo  $\Delta fbp1$  debido a su incapacidad para fusionar las hifas y llevarse a cabo la formación del heterocarion.

Ensayos cuantitativos (ver materiales y métodos) demostraron que la frecuencia de fusión vegetativa de cepas  $\Delta fbp1nit1$  y  $\Delta fbp1nitM$  fue de un 8% y un 3% respectivamente, de la observada en las cepas *nit1* y *nitM* (tabla 15).

**Tabla 15. Frecuencia de fusión vegetativa**

Cepa	Cepa control	Frecuencia
<i>nit1</i>	<i>nitM</i>	1
<i>nitM</i>	<i>nit1</i>	1
$\Delta fbp1nit1$	$\Delta fbp1nitM$	0,08
$\Delta fbp1nitM$	$\Delta fbp1nit1$	0,03

La adhesión de *F. oxysporum* a la raíz de tomate tiene lugar en los primeros estadios de la infección y contribuye a la virulencia (Di Pietro et al, 2001; Prados Rosales & Di Pietro, 2008). La pérdida o deterioro de la capacidad de fusión vegetativa se ha sugerido como una posible causa de la pérdida de la adhesión de las hifas sobre las raíces de tomate (Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Para investigar si Fbp1 es necesaria para la eficiente adhesión de *F. oxysporum* a la raíz de tomate, raíces de plántulas de tomate fueron sumergidas en suspensiones de esporas de las distintas cepas a ensayar, con agitación durante 24 horas. Se observó que tanto la cepa silvestre como la cepa complementada se habían adherido de forma eficiente a la superficie de las raíces laterales y habían formado una red densa de micelio perfectamente visible, mientras que la cepa mutante  $\Delta fbp1$  fué incapaz de adherirse y, por tanto, de colonizar las raíces (figura 23).



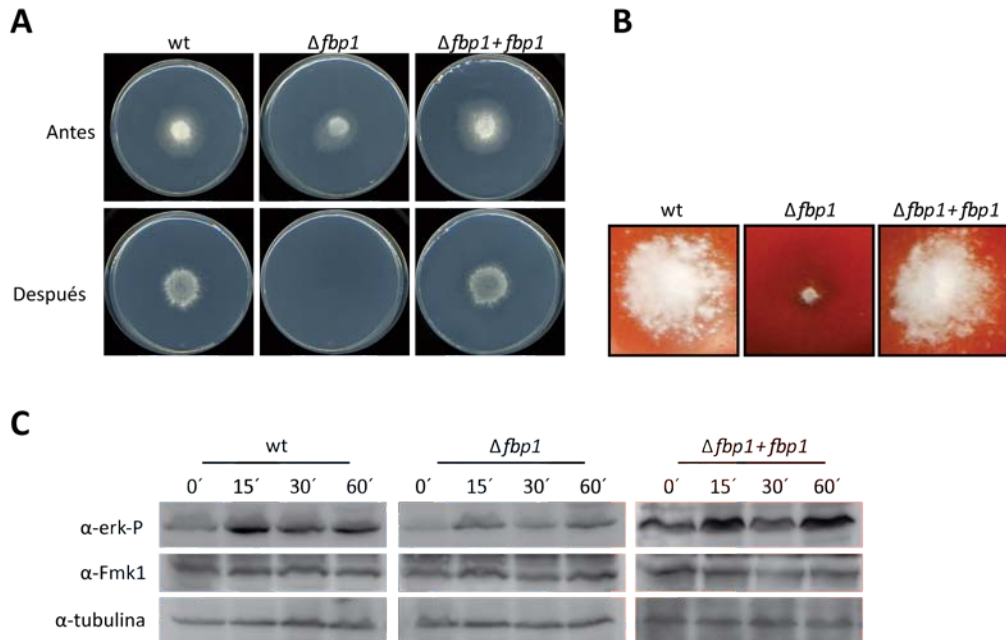
**Figura 23. Fbp1 regula la adhesión al hospedador.** Raíces de plántulas de 15 días fueron sumergidas en cultivos de PDB diluido 50 veces y suplementado con 20 mM de ácido glutámico durante 24 horas. Las raíces fueron lavadas vigorosamente en agua para disociar las uniones débiles antes de ser observadas bajo la lupa binocular. El micelio adherido se observa como una masa blanca que recubre las raíces.

El crecimiento invasivo, un proceso relacionado con la virulencia y similar a la invasión del agar en levaduras, fue determinado mediante el ensayo de penetración del celofán (Prados Rosales & Di Pietro, 2008). A diferencia de la cepa silvestre, el mutante  $\Delta fbp1$  fue incapaz de atravesar la membrana de celofán e invadir el sustrato, lo que sugiere que Fbp1 es importante para el crecimiento invasivo. La penetración del celofán fue restaurada en la cepa complementada (figura 24A).

Para determinar si Fbp1 se requiere para el crecimiento invasivo de *F. oxysporum* sobre tejido vivo del hospedador, se inyectó una suspensión de esporas frescas de las diferentes estirpes en frutos de tomate (cv daniela). La figura 24B muestra el fruto tras 4 días de incubación y aunque la estirpe  $\Delta fbp1$  fue incapaz de crecer sobre el fruto, tanto la estirpe silvestre como la complementada fueron capaces de colonizar y macerar el tejido alrededor del punto de inoculación, formando un micelio denso en la superficie del mismo.

Los fenotipos mostrados por el mutante  $\Delta fbp1$  fueron similares a los previamente observados en estirpes mutantes en la cascada de señalización MAPK Fmk1 (Di Pietro et al, 2001; Perez-Nadales & Di Pietro, 2011; Rispaill & Di Pietro, 2009). Por ello se planteó la hipótesis de que Fbp1 participe en estos fenotipos a través de dicha cascada de señalización. Para investigarlo, se analizó el patrón de fosforilación de Fmk1 en la estirpe  $\Delta fbp1$  en comparación con la estirpe silvestre. Se realizaron análisis *Western blot* de la cepa silvestre con el anticuerpo phospho-p44/42 MAPK detectándose un rápido incremento en los niveles de fosforilación de Fmk1 tras transferir los cultivos de medio líquido a medio sólido (figura 24C). El mutante  $\Delta fbp1$  no mostró estos incrementos en los niveles de fosforilación de la Fmk1, que si se observaron en la estirpe complementada (figura 24C).

Estos resultados indican que Fbp1 es necesaria para la fosforilación de Fmk1 al contacto con una superficie sólida y sugieren que Fbp1 está implicada en los fenotipos analizados, fusión de hifas, adhesión a raíz y crecimiento invasivo, a través de la ruta de señalización MAPK Fmk1.



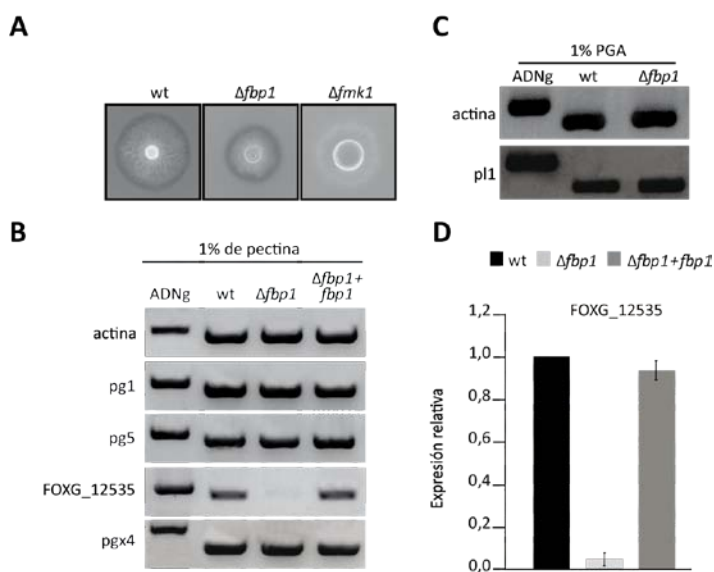
**Figura 24. Fbp1 es requerida para el crecimiento invasivo y contribuye a la fosforilación de Fmk1.** (A) Penetración de membranas de celofán.  $5 \times 10^4$  esporas de cada una de las cepas se crecieron en placas de medio mínimo suplementado con 50 mM de nitrato sódico y cubiertas con una membrana de celofán, durante 4 días a 28°C (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y las placas se incubaron un día más para detectar la presencia del hongo en el medio (después). (B) Crecimiento invasivo en frutos de tomate. Los tomates fueron inoculados con las cepas indicadas e incubados durante 4 días a 28°C con un 100% de humedad. (C) La transferencia a medio sólido induce un cambio transitorio y dependiente de Fbp1 en los niveles de fosforilación de Fmk1. Proteínas totales de las cepas indicadas germinadas 15 horas en PDB y transferidas a placas de MMP durante los periodos de tiempo indicados (minutos), se usaron para realizar análisis *Western blot* con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 MAPK ( $\alpha$ -P-erk) que detecta la fosforilación de Fmk1 y anti-FUS3 para detectar la proteína total. Como control de carga se usó el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -tubulina.

### 1.8. Expresión de enzimas pectinolíticas reguladas por Fbp1

Con el fin de investigar si Fbp1 interviene también en otros procesos regulados por Fmk1 se estudió la expresión de enzimas pectinolíticas (Di Pietro et al, 2001). Si bien el mutante  $\Delta fmk1$  (Delgado-Jarana et al, 2005) no presenta actividad pectinolítica, mutantes afectados en algunos componentes de esta ruta como el factor

de transcripción Ste12 (Rispaill & Di Pietro, 2009) y la mucina Msb2 (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011) son capaces de producir un halo como resultado de la actividad pectinolítica extracelular en medio con ácido poligalacturónico (PGA).

Para saber si Fbp1 está implicado en la formación de halo, esporas frescas de las distintas estirpes se crecieron en medio con PGA y se observó que el mutante  $\Delta fbp1$  producía un halo al igual que la estirpe silvestre (figura 25A). Se analizó la expresión de cuatro poligalacturonasas (*pg1*, *pg5*, FOXG\_12535 y *pgx4*) (figura 25B) y una pectato liasa (*pl1*) (figura 25C), que se expresan en *F. oxysporum* (Ma et al, 2010) y se vio como todas ellas tenían unos niveles de expresión similares entre la cepa silvestre y el mutante  $\Delta fbp1$ , con la excepción del gen FOXG\_12535 (figura 25B), cuyos niveles estaban muy reducidos. Para confirmar esta disminución en el nivel de expresión se llevó a cabo una qPCR. Los resultados indican un papel de Fbp1 en la regulación transcripcional de FOXG\_12535 (figura 25D). Sin embargo, la expresión de *pl1*, una pectato liasa, efector de Fmk1, no se vió afectada por la ausencia de Fbp1.



**Figura 25. *fbp1* controla la expresión de FOXG\_12535.** (A) Producción de halo en medio sólido con ácido poligalacturónico para visualizar la actividad poligalacturonasa extracelular (se observa un halo oscuro alrededor de cada colonia). Las cepas indicadas se pregerminaron 15 horas en PDB, las germinulas se lavaron en agua y se indujeron durante 6 horas con 1% de pectina (B) o con 1% PGA (C). El análisis de la expresión se realizó por RT-PCR a tiempo final. (D) Análisis de la expresión por RT-PCR a tiempo real. El histograma muestra la expresión relativa de la poligalacturonasa FOXG\_12535 en un 1% de pectina en relación a la estirpe silvestre (wt). Los datos fueron normalizados tomando como referencia el nivel del transcrito del gen actina. Las barras de error estándar fueron calculadas a partir de 3 repeticiones técnicas y 3 réplicas biológicas independientes.

### 1.9. Fbp1 es necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta de integridad celular

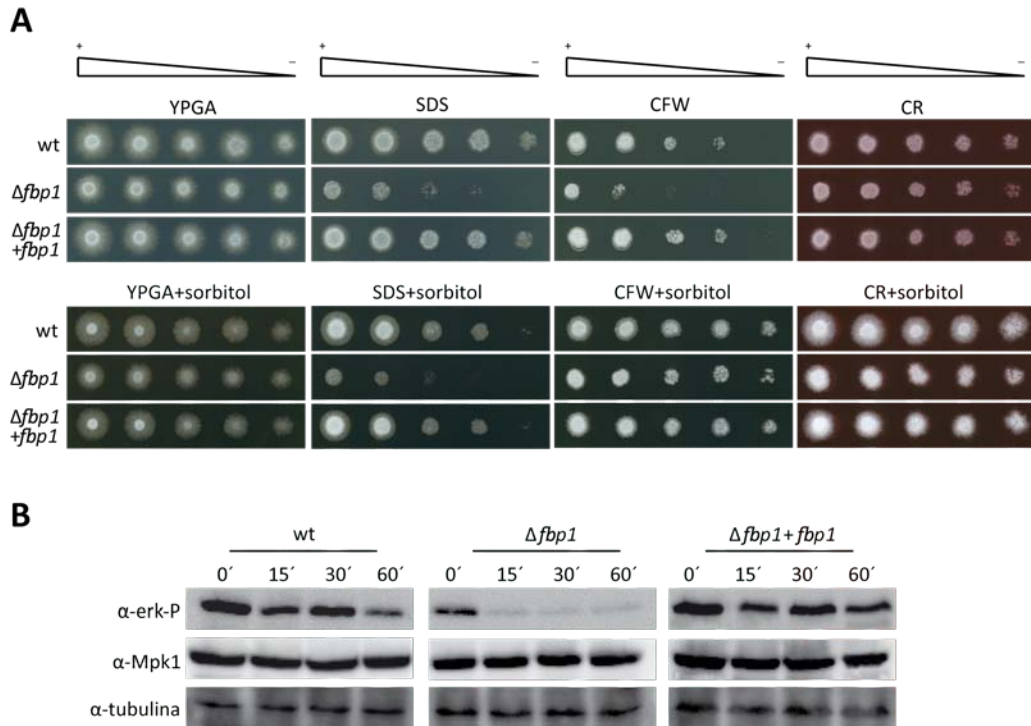
La proteína Fbp1 de *C. neoformans*, un patógeno humano, es requerida para la integridad celular ya que mutantes en este gen presentan sensibilidad a compuestos que afectan a la misma (Liu et al, 2011). Con el fin de conocer si Fbp1 también juega un papel en la integridad de la pared celular en *F. oxysporum* se evaluó el crecimiento del mutante  $\Delta fbp1$  en medio rico YPGA que contenía dodecil sulfato sódico (SDS, 0,0125%), blanco de calcoflúor (CFW, 50 $\mu$ g/mL) o rojo congo (CR, 100  $\mu$ g/mL), compuestos desestabilizadores de la pared (CFW y CR) y de la membrana celular (SDS). Se evaluó, asimismo, el efecto de estos compuestos en presencia de un estabilizador osmótico como es el sorbitol. Los estabilizadores osmóticos restauran el crecimiento silvestre en mutantes fúngicos con defectos en la pared (Borgia et al, 1996; Torres et al, 1991).

El mutante  $\Delta fbp1$  presentó una hipersensibilidad a SDS y CFW, restaurándose el fenotipo en la cepa complementada. Sin embargo, en presencia de CR el crecimiento de las tres estirpes fue similar. La adición de 1,25 M sorbitol recuperó el crecimiento del mutante  $\Delta fbp1$  en CFW y CR, si bien fue más reducido en presencia de SDS (figura 26A).

En levaduras está descrito que algunos componentes de la ruta MAPK de señalización de integridad celular están regulados por ubiquitinación (Molina et al, 2010) y en *C. neoformans* esta ruta está regulada por el complejo SCF (Liu et al, 2011; Wang et al, 2011). Para estudiar si Fbp1 tiene un papel en la regulación de la integridad celular a través de la ruta Mpk1, se estudió el patrón de fosforilación de Mpk1 en la estirpe  $\Delta fbp1$  en comparación con la estirpe silvestre. Se realizaron análisis *Western blot* de la cepa silvestre con el anticuerpo phospho-p44/42 MAPK encontrando un pico en los niveles de fosforilación de la Mpk1 tras tratar los cultivos con 0,013% de SDS durante 30 minutos. El mutante  $\Delta fbp1$  no mostró estos incrementos en los niveles de fosforilación de la Mpk1, que si se observaron en la estirpe complementada (figura 26B).

Estos resultados sugieren que Fbp1 regula la integridad celular a través de la regulación de la fosforilación de Mpk1.





**Figura 26. Fbp1 es esencial para la integridad celular.** (A) Esporas frescas de las cepas indicadas se inocularon de forma seriada desde  $10^4$  a  $10^2$  esporas en placas de medio rico YPGA con SDS, CR ó CFW con o sin 1,25M sorbitol. Las placas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y fueron escaneadas a las 44 horas de crecimiento excepto el tratamiento con CFW que fue escaneado a las 72 horas. (B) Proteínas totales de las cepas indicadas germinadas 15 horas en PDB y sometidas a continuación a un tratamiento con SDS al 0,013%, se usaron para análisis *Western blot* con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 MAPK ( $\alpha$ -P-erk) que detecta la fosforilación de Mpk1 y anti-Mpk1 para detectar la proteína total. Como control de carga se usó el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -tubulina.

### 1.10. Fosfatasa PP2C con dominios PEST

Los resultados presentados anteriormente sugieren que Fbp1 regula la ruta de crecimiento invasivo y de integridad celular a través del control del nivel de fosforilación de Fmk1 y Mpk1, respectivamente, bien por acción de fosfatasa que eliminan los grupos fosfato o bien por la acción de MAPK aguas arriba que estén inactivas y que no fosforilen a Fmk1 o Mpk1.

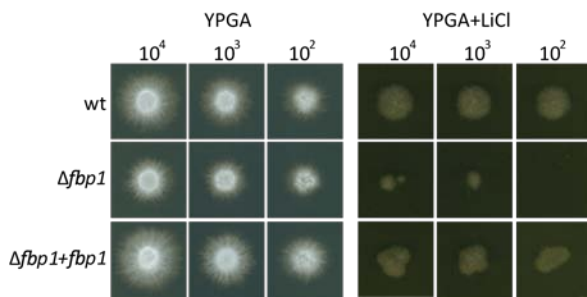
En *S. cerevisiae* se han identificado 7 genes que codifican fosfatasa del tipo 2C, PP2C (Ptc1 a Ptc7), de entre las cuales, Ptc1, Ptc2 y Ptc3 regulan negativamente la ruta HOG (Warmka et al, 2001) y Ptc1, adicionalmente, está implicada en la ruta de integridad celular y en la respuesta a feromona (Arino et al, 2011).

Recientemente se han identificado ortólogos de las siete fosfatasa PP2C de *S. cerevisiae* en *F. graminearum*, de las cuales, la ortóloga de Ptc1 está implicada en la regulación del desarrollo hifal y en la virulencia (Jiang et al, 2011), mientras que la ortóloga de Ptc3 tiene un papel en estrés osmótico y en la resistencia a agentes que dañan la pared celular, además de estar implicada en la virulencia del hongo (Jiang et al, 2011).

Para identificar fosfatasa PP2C en el genoma de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* se realizó un análisis *in silico* con la información disponible en la base de datos de *Fusarium* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/)) usando el algoritmo BLASTp y tomando como punto de partida las fosfatasa PP2C identificadas en *F. graminearum*. Se identificaron 7 genes que codifican fosfatasa PP2C (Ptc1, Ptc3, Ptc5, Ptc5R, Ptc6, Ptc7 y Ptc7R), tres de las cuáles (Ptc1, Ptc3 y Ptc7R) contienen un dominio PEST que indica la degradación de estas proteínas por el proteasoma.

La hipótesis que se plantea es que estas fosfatasa PP2C sean posibles reguladores del avance de las rutas de crecimiento invasivo e integridad celular a través de la defosforilación de Fmk1 y Mpk1, respectivamente. A su vez, este proceso estaría regulado por Fbp1 que se encargaría de la degradación de PP2C mediada por proteasoma. En ausencia de Fbp1, las fosfatasa PP2C no serían enviadas a proteasoma y por tanto el nivel de fosforilación de las quinasas Fmk1 y Mpk1 sería muy bajo interrumpiendo así la vía de señalización.

Para iniciar este estudio se evaluó la sensibilidad del mutante  $\Delta fbp1$  de *F. oxysporum* a LiCl, dado que en *F. graminearum*, la fosfatasa Ptc3 está implicada en la resistencia a metales, entre ellos LiCl (Jiang et al, 2010). Estudios preliminares demostraron que la estirpe  $\Delta fbp1$  presenta una mayor sensibilidad a este compuesto (figura 27). Estos resultados podrían indicar un papel de Fbp1 en la estabilidad de Ptc3, sugiriendo que en ausencia de Fbp1 la fosfatasa Ptc3 no sea degradada por el proteasoma y que por tanto su acumulación afecte a la ruta de asimilación del LiCl suponiendo una mayor sensibilidad al compuesto en este mutante.



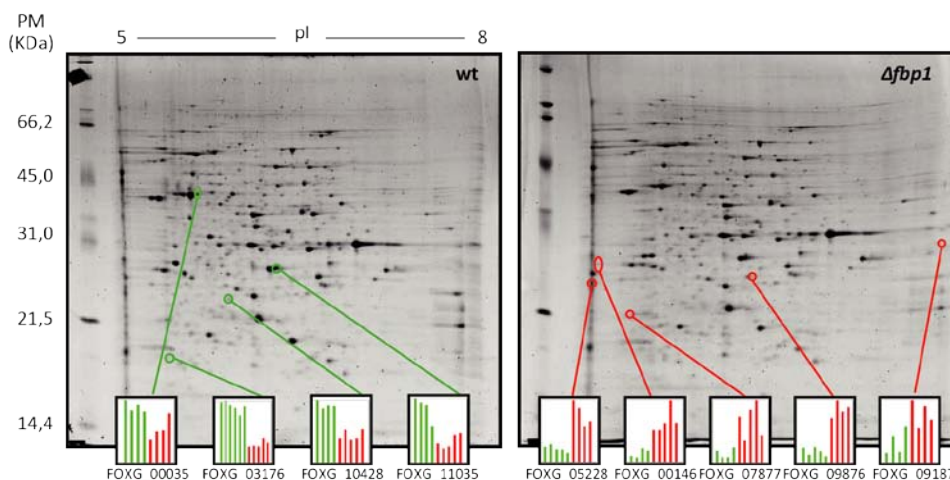
**Figura 27. Efecto de la delección de *fbp1* en la utilización de LiCl.** Esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron 40 horas a 28°C en medio YPGA o suplementado con 0,3M de LiCl.

## 2. Identificación proteómica de posibles dianas reguladas por el sistema SCF<sup>Fbp1</sup>

Uno de los objetivos principales de este trabajo fué identificar posibles proteínas diana del complejo SCF<sup>Fbp1</sup>. Se planteó la hipótesis de que la ausencia de Fbp1 impide la degradación de las proteínas diana por el proteasoma 26S, y por tanto, éstas deberían ser más abundantes en la cepa mutante  $\Delta fbp1$  que en la cepa silvestre. Para desarrollar nuestra hipótesis se llevo a cabo un abordaje proteómico.

### 2.1. Perfil proteico, por electroforesis bidimensional, de la cepa silvestre y el mutante $\Delta fbp1$

Se obtuvieron proteínas totales de germínulas crecidas en condiciones en las que la cepa mutante  $\Delta fbp1$  presentó el fenotipo de ausencia de crecimiento invasivo. Las proteínas se precipitaron siguiendo el protocolo descrito por Wessel & Flugge (1984) y se cuantificaron con el reactivo de Bradford. Se usaron 150  $\mu$ g de proteínas para cada gel y se realizaron 6 réplicas biológicas de cada una de las cepas. Las muestras se sometieron a electroforesis bidimensional y posteriormente, los geles se tiñeron con SYPRO ruby siendo escaneados a una longitud de onda de 535 nm y una resolución de 100  $\mu$ m (figura 28).



**Figura 28. Imágenes de extractos proteicos de la cepa silvestre y la cepa mutante  $\Delta fbp1$  sometidos a electroforesis bidimensional.** Las proteínas se obtuvieron de germínulas crecidas 8 horas en placas de medio mínimo y se sometieron a una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida que fueron teñidos con SYPRO-Ruby. Algunas de las proteínas diferencialmente expresadas se indican en los paneles inferiores de la imagen. Las barras verdes indican los valores de intensidad de las proteínas en la estirpe silvestre para cada uno de los geles, y las rojas los valores de la estirpe mutante.

El análisis de los geles, que se realizó usando el programa *PD-QUEST*, mostró cambios estadísticamente significativos en la expresión de 80 proteínas, las cuales, tras ser escindidas de los geles y digeridas con tripsina, pudieron ser analizadas e identificadas por MALDI-TOF-TOF (tabla S1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23855991>). Las proteínas se re-anotaron mediante búsquedas BLAST contra la base de datos de *Fusarium* obteniéndose 46 proteínas, de las que 41 fueron proteínas únicas (tabla 16). La comparación de los proteomas de la estirpe silvestre y mutante reveló que 17 spots fueron más abundantes en la cepa mutante  $\Delta fbp1$  que en la silvestre, y 24 spots más abundantes en la cepa silvestre que en la estirpe mutante (tabla 16).

**Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa mutante *Δfbp1* y la cepa silvestre identificadas por MALDI-TOF/TOF.** Las proteínas se han clasificado de acuerdo a su función biológica. <sup>a</sup> N° spot, asignado por el programa de análisis *PD-QUEST* (versión 8.0.1, Bio-Rad), <sup>b</sup> Anotación de la base de datos de *Fusarium* (*Broad Institute for Genome Information*, MIT), <sup>c</sup> Valor medio de las seis réplicas, <sup>d</sup> Peso molecular teórico/ peso molecular experimental, <sup>e</sup> Punto isoelectrico teórico/Punto isoelectrico experimental, <sup>f</sup> número de péptidos identificados, <sup>g</sup> Resultado obtenido del motor de búsqueda MASCOT, puntuaciones superiores a 55 fueron consideradas como una identificación positiva, <sup>h</sup> Probabilidad de que las medias de cada muestra fuesen iguales, como se determinó con una *t*-student con un *p*< 0,05. <sup>†</sup> Resultados obtenidos tras un Blastp en la base de datos del NCBI y usando como proteínas a identificar aquellas con función desconocida e identificadas en la base de datos de *Fusarium*.

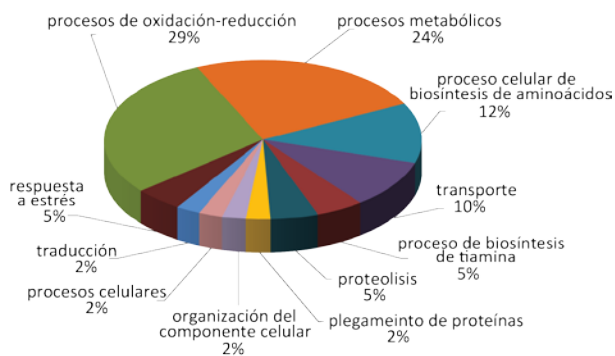
N° spot <sup>a</sup>	Proteína <sup>b</sup>	Número de acceso	Ratio <sup>c</sup> <i>Δfbp1</i> vs wt	PM <sup>d</sup>	pI <sup>e</sup>	% cobertura secuencia	NP <sup>f</sup>	Puntuación <sup>g</sup>	p-valor <sup>h</sup>
<b>Procesos de oxidación-reducción</b>									
1146	Peroxiredoxina 1	FOXG_10111	2,05	22,8/19,1	4,9/5,4	35	9	303	0,0003
2614	D-lactato deshidrogenasa 2, precursor mitocondrial	FOXG_02132	-2,32	61,9/59,2	5,8/5,6	33	15	234	0,0003
2718	GMC oxidoreductasa <sup>†</sup>	FOXG_16628	-4,06	67,4/77,2	5,2/5,6	14	9	137	0,0001
3317	Tioredoxin reductasa	FOXG_00831	-1,79	35,6/39,4	5,3/6,0	45	10	239	0,0005
4115	Alcohol deshidrogenasa 2	FOXG_12790	1,96	38,0/21,3	7,0/6,2	18	5	134	0
4123	oxidoreductasa, cadena corta deshidrogenasa/reductasa	FOXG_11785	-3,10	26,3/25,1	5,8/6,1	37	7	80	0,0004
4310	oxidoreductasa, familia de deshidrogenasas de unión a zinc <sup>†</sup>	FOXG_15241	-1,77	39,1/40,2	5,5/6,2	40	10	272	0
5216	Aldo-keto-reductasa <sup>†</sup>	FOXG_09876	3,10	31,9/35,0	5,7/6,4	55	14	372	0,0084
6714	phenol 2-monooxigenasa <sup>†</sup>	FOXG_17384	-7,95	24,1/76,5	5,8/6,6	32	6	69	0
7416	Oxidoreductasa <sup>†</sup>	FOXG_04413	-1,62	40,1/42,2	6,3/7,0	37	14	413	0,0042
8225	Uricasa	FOXG_11511	-4,64	34,1/35,2	6,7/7,7	44	11	154	0,0142
9311	quinona oxidoreductasa Qor1	FOXG_09187	2,15	35,2/39,8	7,8/8,0	27	6	84	0,0398
<b>Procesos metabólicos</b>									
125	Hidrolasa de la superfamilia HAD	FOXG_07877	4,51	27,2/27,8	4,9/5,3	23	5	101	0,0076
1010	Metiltransferasa <sup>†</sup>	FOXG_03176	-3,02	23,3/15,7	5,2/5,5	48	9	238	0
1618	Glucosa N-acetiltransferasa	FOXG_12436	-4,64	21,2/62,4	5,1/5,6	54	8	62	0,0011
2610	Enolasa	FOXG_00035	-1,64	47,4/56,6	5,1/5,7	55	17	749	0,0117
2620	Lactonohidrolasa	FOXG_16906	-3,08	43,2/65,6	5,1/5,7	31	11	277	0,0115
4214	Proteína de la biosíntesis de la piridoxina PDX1	FOXG_08652	-1,39	32,9/35,9	5,4/6,1	36	11	356	0,0118

<b>Procesos metabólicos</b>									
4420	Piruvato descarboxilasa PdcA	FOXG_08146	1,49	63,5/43,1	5,7/6,0	22	10	298	0,0405
7821	Aconitato hidratasa, precursor mitocondrial	FOXG_03713	-2,48	85,9/92,7	6,2/6,9	17	11	203	0,02
8213	S-formilglutación hidrolasa	FOXG_02259	-1,52	31,3/32,6	6,4/7,2	24	5	100	0,0002
8414	Formiato deshidrogenasa	FOXG_07841	-1,88	40,2/43,1	6,2/7,2	20	7	143	0,0129
<b>Proceso celular de biosíntesis de aminoácidos</b>									
2412	Glutamina sintetasa	FOXG_05182	-1,81	38,8/41,9	5,5/5,8	37	15	296	0
6418	Aspartato-semialdeido deshidrogenasa	FOXG_03301	-3,30	39,4/44,6	6,1/6,5	11	3	71	0,0001
6514	O-acetilhomoserina	FOXG_15240	-1,77	47,1/46,9	5,9/6,6	38	15	439	0,0006
6523	Glutamato deshidrogenasa NADP	FOXG_01626	1,92	49,6/50,8	5,8/6,7	28	11	268	0,0165
8512	5-metiltetrahydropteriloltriglutamato-homocisteina metiltransferasa	FOXG_12759	1,61	86,7/51,4	5,9/7,4	19	11	113	0,0114
<b>Proceso de biosíntesis de tiamina</b>									
3228	Proteína STI35	FOXG_10428	-2,07	34,8/33,8	5,9/6,0	25	6	109	0
5317	Precursor de pirimidina para la biosíntesis de la enzima THI13	FOXG_11035	-2,51	38,5/37,6	5,7/6,4	39	14	368	0,0015
<b>Respuesta a estrés</b>									
4717	Proteína de choque térmico SSB1	FOXG_00893	1,28	67,0/75,5	5,2/6,1	9	6	55	0,0087
6222	Proteína de choque térmico de 30KDa	FOXG_00233	-1,72	24,2/33,9	5,9/6,6	34	7	218	0,0022
<b>Transporte</b>									
210	Subunidad épsilon del coatómero	FOXG_05228	4,39	31,6/34,0	4,8/5,0	30	6	138	0,0015
1221	Proteína de fusión vesicular Sec17	FOXG_08026	-1,49	33,2/34,0	4,9/5,4	43	13	142	0,005
4620	ARN helicasa dependiente de ATP, DBP5	FOXG_05321	2,39	53,0/63,1	5,5/6,2	35	15	190	0
8113	Proteína porina de la membrana mitocondrial externa	FOXG_05491	2,64	29,7/29,7	8,8/7,6	26	8	91	0,0019
<b>Proteolisis</b>									
3610	Glutamato carboxipeptidasa	FOXG_05532	-1,45	52,6/57,2	5,2/5,8	29	13	247	0,0012
3812	Amino peptidasa B	FOXG_11102	1,42	99,1/105,1	5,9/5,3	18	16	83	0,0019
<b>Plegamiento de proteínas</b>									
826	Proteína de choque térmico 81-1	FOXG_04346	2,05	79,2/94,4	4,8/5,1	24	14	239	0,0165
<b>Traducción</b>									
310	Factor de elongación 1-beta	FOXG_00385	2,13	25,2/37,8	-/4,36	18	3	111	0
<b>Organización del componente celular</b>									
4314	Subunidad gamma parcial de la actina mRNA <sup>†</sup>	FOXG_01569	1,39	41,8/39,7	5,4/6,2	14	4	148	0,0472
<b>Procesos celulares</b>									
214	Proteína 14-3-3	FOXG_00146	5,08	29,9/36,7	4,8/5,0	40	10	170	0,0008

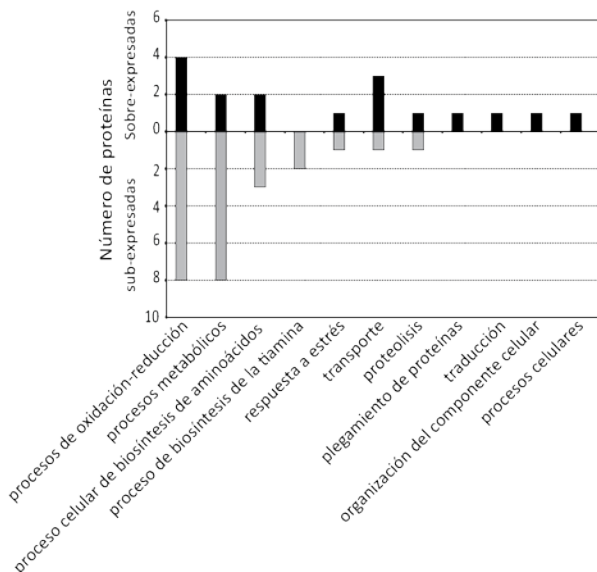
Se asignaron categorías funcionales a las proteínas de acuerdo a su implicación en un proceso biológico concreto. Esta clasificación se basó en el *gene ontology* (GO) y usando la información disponible en la base de datos UniProt-GO (<http://www.ebi.ac.uk/GOA>).

La clasificación de las proteínas de acuerdo a su función biológica mostró 11 grupos bien diferenciados. Más del 50% de las proteínas se encontraban en dos categorías: (i) procesos de oxidación-reducción (29%) y (ii) procesos metabólicos (24%) (figura 29A). Cabe destacar que la mayoría de las proteínas sobre-expresadas en la estirpe silvestre se corresponden a estas categorías que son más generales, sin embargo, las proteínas sobre-expresadas en la estirpe mutante están implicadas en procesos más específicos como proteólisis, respuesta a estrés, plegamiento de proteínas, organización de los componentes celulares, procesos celulares y traducción (figura 29B).

A



B



**Figura 29. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.** (A) El gráfico circular representa la distribución (%) de las proteínas diferencialmente expresadas (tabla 4) en base al proceso biológico del que forman parte de acuerdo al *gene ontology* (GO). (B) Clasificación de las proteínas sobre y sub-expresadas en la cepa mutante  $\Delta fbp1$  de acuerdo a su función biológica.



## 2.2. Proteínas sobre-expresadas en el mutante $\Delta fbp1$

Entre los spots identificados como más abundantes en el mutante  $\Delta fbp1$  dos de ellos se correspondieron a proteínas implicadas en **tráfico vesicular**: (i) la subunidad épsilon del coatómero, Sec28 (FOXG\_05228), un componente de la ruta retrógrada que pertenece a las proteínas COPI, las cuales se encargan de la síntesis y clasificación de las vesículas que van desde el complejo de Golgi al retículo endoplasmático a través del transporte retrógrado (Cai et al, 2007; Cosson et al, 1996; Spang, 2002) ; y (ii) el gen FOXG\_00146, que se corresponde con una proteína 14-3-3 ortóloga a BMH2 de *S. cerevisiae*. Las proteínas 14-3-3 son proteínas diméricas muy abundantes en el citosol que interactúan con una gran cantidad de sustratos celulares controlando con ello múltiples procesos celulares, entre los cuales se encuentra el tráfico vesicular (Yuan et al, 2003).

El proteoma del mutante  $\Delta fbp1$  mostró también dos **chaperonas** sobre-expresadas. FOXG\_00893 (ortóloga a SSB1 de *S. cerevisiae*) y FOXG\_04346, un miembro de la familia de las chaperonas Hsp90 (Peisker et al, 2010). La chaperona Hsp90 está implicada en el proceso de degradación de proteínas asociado al retículo endoplasmático (ERAD), el cual comienza con el reconocimiento de la proteína diana, seguido de la ubiquitinación de la misma y finalmente la retrotranslocación de ésta desde el retículo endoplasmático al proteasoma 26S para su degradación (Ciechanover, 2005).

Con respecto a la **patogenicidad**, una de las proteínas más abundantes en el mutante, FOXG\_07877, se corresponde a una adhesina de la superfamilia HAD (haloacid dehalogenase), ortóloga de una proteína de adhesión de 32 kDa que juega un papel importante en la adhesión y patogenicidad en el patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis* (Gonzalez et al, 2008). Otra proteína diferencialmente expresada y supuestamente implicada en patogenicidad fue FOXG\_12759, el ortólogo de MET6, una sintetasa de metionina independiente de cobalamina, que es esencial para la completa virulencia en el patógeno humano *C. neoformans* (Pascon et al, 2004).

Tanto los organismos eucariotas como los procariotas generan **especies reactivas de oxígeno** (EROs) como producto de su metabolismo, fundamentalmente a través de la respiración aeróbica. Uno de los mecanismos que suministra poder

reductor es el sistema redox glutatión-tioredoxina. La proteína FOXG\_10111 corresponde a una peroxiredoxina, una importante clase de antioxidantes celulares identificados en una gran cantidad de organismos (Rhee et al, 2005). FOXG\_09187 es un ortólogo de ZTA1, una quinona reductasa dependiente de NADPH en *S. cerevisiae*. Recientemente se ha demostrado que el complejo proteico formado por la quinona reductasa y el proteasoma 20S estabiliza factores de transcripción gracias a que actúa como un inhibidor de su degradación por el proteasoma (Sollner & Macheroux, 2009). Finalmente, también se identificó una alcohol deshidrogenasa 2 (FOXG\_12790) y una aldo-queto-reductasa (FOXG\_09876), ambas implicadas en glicolisis y gluconeogénesis y relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo (Aguirre et al, 2005).

### **2.3. Proteínas sub-expresadas en el mutante $\Delta fbp1$**

El grupo más abundante de proteínas sub-expresadas en el mutante se corresponde con aquellas implicadas en procesos de oxidación-reducción y procesos metabólicos (figura 29A). Dentro de estas proteínas encontramos ocho óxido-reductasas: una tioredoxin-reductasa (FOXG\_00831), una uricasa (FOXG\_11511), un precursor mitocondrial de una D-lactato deshidrogenasa 2 (FOXG\_02132) y varias proteínas no anotadas pero identificadas como pertenecientes a diferentes familias de óxido-reductasas. También se sobre-expresó una fenol 2-monooxigenasa (FOXG\_17384) en la cepa silvestre. Se trata de una hidrolasa implicada en la degradación de compuestos fenólicos. Se sabe que una gran cantidad de los metabolitos secundarios antifúngicos que las plantas son capaces de producir son compuestos fenólicos cuya detoxificación facilita la colonización del hospedador por parte del hongo (Michielse et al, 2012).

Las proteínas que constituyen el grueso de las sobre-expresadas en la cepa silvestre pertenecen al metabolismo primario y entre ellas encontramos, una enolasa (FOXG\_00035), implicada en glucolisis y gluconeogénesis, y una aconitasa (FOXG\_03713), requerida para el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA); también aparecen enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos como la aspartato-semialdehído deshidrogenasa (FOXG\_03301), la cual funciona en la vía de síntesis común de la metionina y la treonina, una O-acetilhomoserina (FOXG\_15240), implicada en la ruta de biosíntesis de la metionina y la cisteína, y una glutamina

sintetasa (FOXG\_05182), una enzima clave para la biosíntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio.

Otra enzima metabólica sobre-expresada en la cepa silvestre fue la N-acetilglucosamina transferasa Gnt1 (FOXG\_12436). Se ha demostrado que esta enzima, localizada en las cisternas del aparato de Golgi, participa en la maduración y elongación de los N-glicanos de algunas proteínas de pared, así como de otras intra- o extracelulares en *F.oxysporum* (López-Fernández et al, 2013).

La síntesis de las vitaminas B6 y B1 también está regulada por Fbp1. La cepa mutante  $\Delta fbp1$  mostró una menor intensidad en el spot de la proteína correspondiente a la Pdx1 (FOXG\_08652), que es el ortólogo de SNZ1 en *S. cerevisiae* y que funciona en la biosíntesis de la vitamina B6. Del mismo modo, dos componentes de la biosíntesis de la vitamina B1 (tiamina), el precursor hidroximetilpirimidina (FOXG\_11035) y el intermediario del anillo tiazol (FOXG\_10428) se encontraron sub-expresados en el mutante  $\Delta fbp1$ .

Entre los spot sobre-expresados en la estirpe silvestre encontramos dos proteínas implicadas en la fusión de vacuolas y en el transporte de proteínas. FOXG\_08026, identificada como un ortólogo de SEC17, es una proteína t-SNARE requerida para el transporte vesicular entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (Haas & Wickner, 1996) y FOXG\_00035 que codifica para una enolasa. Se ha demostrado que las proteínas ENO1 y la ENO2 de *S. cerevisiae* son necesarias para la fusión de vacuolas (Decker & Wickner, 2006).

Queda por demostrar si las proteínas identificadas en *F. oxysporum* son realmente ubiquitinadas y reguladas por el proteosoma. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que las proteínas detectadas como diferencialmente expresadas en nuestro análisis proteómico son reguladas por Fbp1 y por tanto potenciales dianas de ubiquitinación y degradación por el sistema SCF<sup>Fbp1</sup>. En este sentido, la mayoría de las proteínas diferencialmente expresadas en nuestro análisis tienen ortólogos en *S. cerevisiae* que han sido encontrados ubiquitinados en varios estudios (tabla 17).

**Tabla 17. Proteínas identificadas en este estudio que previamente han sido encontradas ubiquitinadas.**

Gen Fo4287	Gen <i>S. cerevisiae</i>	Descripción	(Venancio et al, 2009) <sup>a</sup>	(Ziv et al, 2011) <sup>b</sup>
<b>Proteínas más abundantes en la estirpe silvestre</b>				
FOXG_00035	ENO1	Enolasa	SI	SI
FOXG_00831	TRR1	Tioredoxin reductasa	NO	SI
FOXG_02132	DLD2	D-lactato deshidrogenasa 2	-	SI
FOXG_03301	HOM2	Aspartato-semialdehído	SI	SI
FOXG_03713	ACO1	Aconitato hidratasa	NO	SI
FOXG_05182	GLN1	Glutamina sintetasa	SI	SI
FOXG_05532	DUG1	Glutamato carboxipeptidasa	NO	NO
FOXG_07841	FDH1	Formiato deshidrogenasa	NO	NO
FOXG_08026	SEC17	Proteína de fusión vesicular	-	SI
FOXG_10428	THI4	Proteína STI35	NO	NO
FOXG_11035	THI13	Precursor de pirimidina para	NO	NO
FOXG_12436	GNT1	N-acetilglucosamina	-	SI
FOXG_15240	MET17	O-acetilhomoserina	SI	NO
<b>Proteínas más abundantes en la cepa mutante <i>Δfbp1</i></b>				
FOXG_00146	BMH2	Proteína 14-3-3	SI	SI
FOXG_00385	EFB1	Factor de elongación 1	NO	SI
FOXG_00893	SSB1	Proteína de choque térmico	-	SI
FOXG_01569	ACT1	Subunidad gamma de la	SI	SI
FOXG_01626	GDH1	Glutamato deshidrogenasa	SI	SI
FOXG_04346	HSC82	Proteína de choque térmico	-	SI
FOXG_05228	SEC28	Subunidad épsilon del	SI	SI
FOXG_05321	DBP5	ARN helicasa dependiente de	NO	NO
FOXG_07877	YOR131C	Hidrolasa de la superfamilia	-	SI
FOXG_08146	PDC1	Piruvato descarboxilasa PdcA	SI	SI
FOXG_09187	ZTA1	Quinina oxidoreductasa	SI	SI
FOXG_11102	APE2	Aminopectidasa B	SI	SI
FOXG_12759	MET6	Metiltransferasa	-	SI
FOXG_12790	ADH2	Alcohol deshidrogenasa 2	SI	SI

<sup>a</sup>Ubiquitinación encontrada en (Venancio et al, 2009).

<sup>b</sup>Ubiquitinación encontrada en (Ziv et al, 2011).

### **3. Bmh1 y Bmh2 son dos proteínas 14-3-3 con diferentes funciones en *F. oxysporum***

Una de las proteínas más sobre-expresadas en el mutante  $\Delta fbp1$  según el análisis proteómico (apartado 2), fué la codificada por el gen FOXG\_00146. Se trata de una proteína perteneciente a la familia 14-3-3, y anotada en la base de datos como Bmh2.

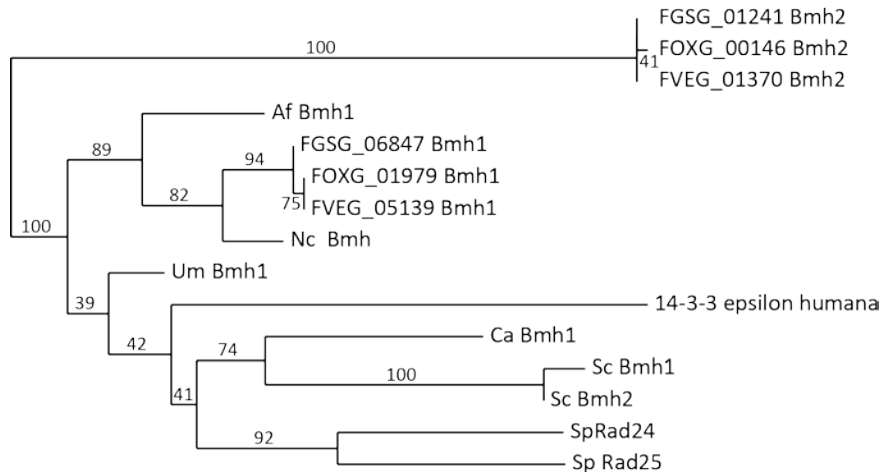
Se conoce mucho a cerca de las proteínas 14-3-3 tanto en humanos como en levaduras. Es una gran familia de proteínas altamente conservadas, presentes en todos los organismos eucariotas y capaces de interactuar con multitud de proteínas, preferentemente fosforiladas, implicadas en muchos procesos celulares diferentes.

En hongos filamentosos las proteínas 14-3-3 han sido muy poco estudiadas y nada se sabe acerca del papel que puedan jugar en la patogénesis fúngica. Todo esto nos llevó a investigar la implicación de esta proteína en la patogénesis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

#### **3.1. Identificación y análisis de proteínas 14-3-3 en *Fusarium*.**

La búsqueda de proteínas 14-3-3 en los genomas de *Fusarium* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/)) reveló la existencia de dos genes (*bmh1* y *bmh2*) en cada una de las tres especies del género. Para evaluar el grado de conservación y evolución de las proteínas Bmh en hongos, se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias proteicas, obtenidas mediante análisis *Blastp* y alineadas con *T-Coffe*, de distintas especies de hongos y de la isoforma épsilon de las proteínas 14-3-3 humana (figura 30).

El árbol filogenético presentó las proteínas 14-3-3 de los hongos filamentosos bien separadas del resto. De igual forma, las proteínas Bmh1 y Bmh2 del género *Fusarium* aparecen en ramas distintas. Sin embargo, los ortólogos más próximos de las proteínas de *F. oxysporum*, como son los de *F. graminearum* y *F. verticilloides*, aparecen muy próximos entre sí en el mismo nodo y rama.

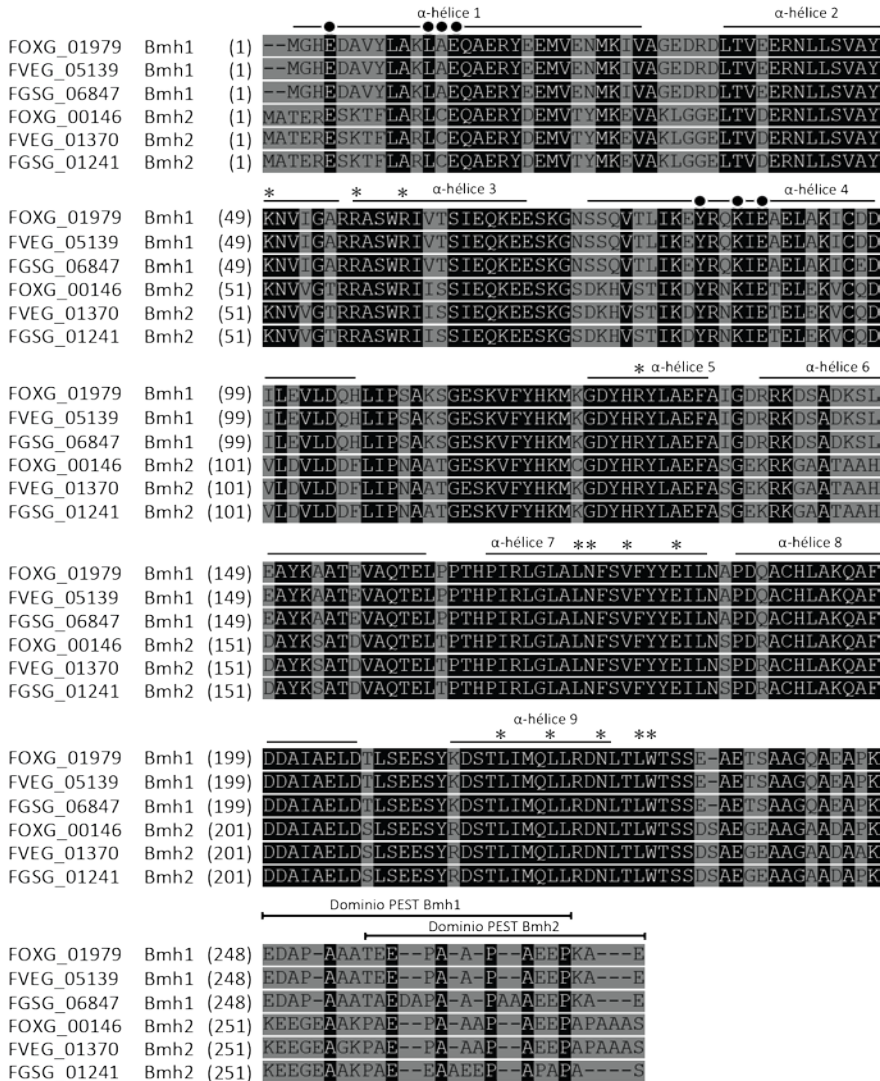


**Figura 30. Análisis filogenético de proteínas 14-3-3.** El filograma se realizó mediante el programa PhyML utilizando el método de máxima probabilidad con un bootstrap de 500 y a través del servidor *Phylogeny* (<http://www.phylogeny.fr/>). Las secuencias fueron alineadas usando el algoritmo *T-Coffee*. FGSG: *Fusarium graminearum*, FOXG: *Fusarium oxysporum*, FVEG: *Fusarium verticillioides*, Af: *Aspergillus fumigatus*, Nc: *Neurospora crassa*, Um: *Ustilago maydis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*.

Para un análisis más detallado se alinearon las 6 proteínas Bmh de las tres especies de *Fusarium* presentes en el Broad Institute presentando una similaridad del 75%, llegando a ser prácticamente idénticas (> 94%) cuando se compararon las Bmh1 y Bmh2 entre sí, respectivamente (figura 31). Al igual que ocurre en levaduras y en otros ortólogos fúngicos, Bmh1 y Bmh2 presentaron las 9  $\alpha$ -hélices características de estas proteínas.

El análisis *epest* (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) indicó la presencia de un dominio PEST en el extremo carboxilo de todas las proteínas analizadas, con la excepción de Bmh2 en *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Sin embargo, solamente el cambio de una alanina por glutámico en la posición 273 haría que Bmh2 pasase a tener un potencial dominio PEST. Este cambio de aminoácido se deriva de una mutación puntual de tipo transversión donde una citosina es reemplazada por una adenina.

Los dominios de dimerización y de unión a ligando están altamente conservados en todas las proteínas 14-3-3, desde levaduras a humanos (Tzivion et al, 2001). Bmh1 y Bmh2 mantienen todos los residuos conservados, siendo la única excepción la alanina, conservada en la posición 13, en Bmh1, que es sustituida por una cisteína en Bmh2 (figura 31).



**Figura 31. Alineamiento de las proteínas 14-3-3 del género *Fusarium*.** Las secuencias proteicas fueron alineadas usando el algoritmo *T-Coffee*. Las posiciones de los aminoácidos en la estructura primaria de las distintas proteínas se indican a la izquierda. Las α-hélices se han localizado usando la herramienta *PSIPRED* disponible en el servidor *Swiss-model*. Los círculos negros indican residuos implicados en dimerización y los asteriscos residuos implicados en unión al ligando. Los residuos idénticos están sombreados en negro. *Fusarium oxysporum* (FOYG), *Fusarium verticilloides* (FVEG), *Fusarium graminearum* (FGSG).

### 3.2. Obtención de estirpes mutantes en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para determinar el papel biológico de las proteínas Bmh1/2 de *F.oxysporum*, así como su implicación en la virulencia del hongo se generaron estirpes mutantes mediante reemplazamiento génico usando la técnica *Split Marker* (Catlett et al, 2003),

que permite sustituir la fase abierta de lectura del alelo silvestre por un marcador seleccionable. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que permitían amplificar a partir de ADN<sub>g</sub>, y mediante PCR, fragmentos de aproximadamente 1 Kb flanqueantes a la ORF del gen diana, en los extremos 5' y 3'. Cada fragmento, por separado, se fusionó al 75% del casete de resistencia a higromicina B (Hyg<sup>R</sup>) mediante PCR de fusión (Carroll et al, 1994), resultando dos construcciones solapantes (figura 32A y 33A). Éstas se utilizaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre, con el fin de reemplazar el gen diana por el marcador seleccionable Hyg<sup>R</sup>. Los transformantes obtenidos se analizaron inicialmente por PCR y posteriormente se verificaron por análisis Southern.

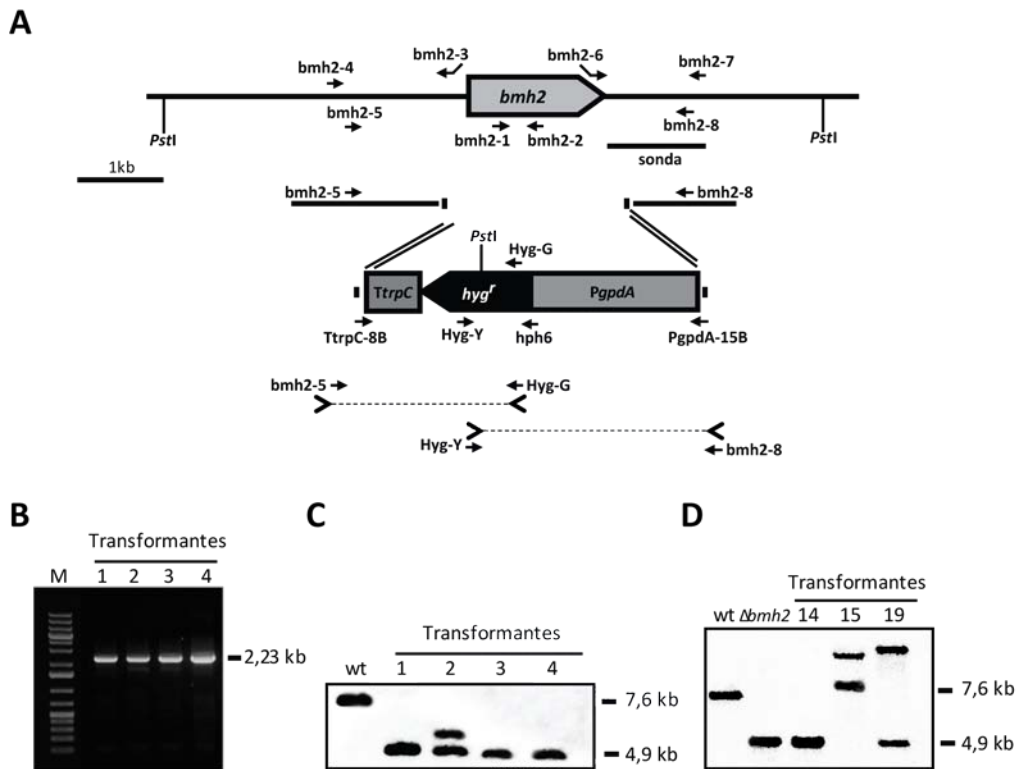
### 3.2.1. Interrupción dirigida del gen *bmh2* (FOXG\_00146)

La proteína deducida para el gen *bmh2* contiene 276 aa y su secuencia génica se encuentra interrumpida por 4 intrones.

De entre los transformantes seleccionados, cuatro de ellos mostraron la aparición de un fragmento del tamaño deseado tras amplificar con un cebador interno al casete de la higromicina y otro externo a la construcción empleada en 5' (figura 32B). Posteriormente, se verificó el número de copias integradas mediante análisis *Southern*, digiriendo el ADN<sub>g</sub> con *Pst*I e hibridando con una sonda (*bmh2*-6 y *bmh2*-7) de la región 3' (figura 32A). Tres de los transformantes analizados reemplazaron la banda de 7,6 kb esperada en la estirpe silvestre por otra de 4,9 kb, presentando así el patrón de bandas esperado para un recombinante homólogo (figura 32C).

La complementación del mutante  $\Delta$ *bmh2* se realizó mediante cotransformación de protoplastos de la estirpe mutante con el casete de resistencia a fleomicina (Phle<sup>R</sup>) y el alelo silvestre *bmh2* amplificado con los cebadores *bmh2*-4 y *bmh2*-7. En el análisis *Southern* (ADN<sub>g</sub> tratado con *Pst*I), el transformante #19 presentó una banda de 4,9 kb, correspondiente al alelo mutado, y adicionalmente una banda de mayor tamaño, correspondiente a la copia silvestre del gen (figura 32D).



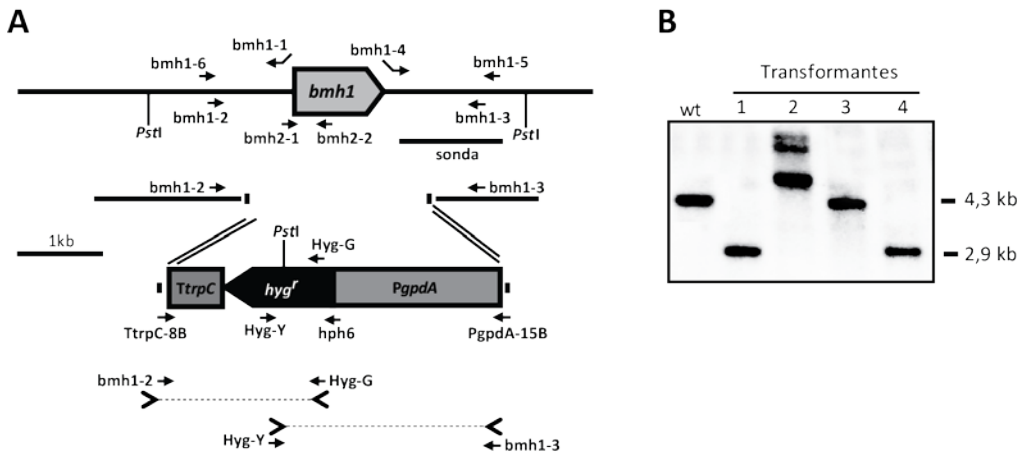


**Figura 32. Interrupción dirigida del gen *bmh2*.** (A) Representación esquemática del locus *bmh2* y del casete de interrupción con el marcador seleccionable obtenido mediante la técnica *Split Marker*. (B) Análisis de los transformantes mediante PCR con los cebadores específicos *bmh2-4* (externo a la construcción en 5') y *hph6* (higromicina). (C) Análisis de los transformantes mediante hibridación *Southern*; ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con *PstI*, separado en un gel al 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada. (D) Análisis de los complementados mediante hibridación *Southern* del ADNg tratado con *PstI* e hibridado con la sonda indicada en (A).

### 3.2.2. Interrupción dirigida del gen *bmh1* (FOXG\_01979)

La proteína deducida para el gen *bmh1* contiene 268 aa y su secuencia génica está interrumpida por cinco intrones.

Los transformantes obtenidos para delecionar el gen *bmh1* se analizaron por *Southern*, digiriendo el ADNg con *PstI* e hibridando con una sonda (*bmh1-4* y *bmh1-5*) de la región 3' (figura 33A). Dos de los transformantes analizados, #1 y #4, reemplazaron la banda de 4,3 kb esperada en la estirpe silvestre por otra de 2,9 kb, presentando el patrón de bandas esperado para un recombinante homólogo (figura 33B).

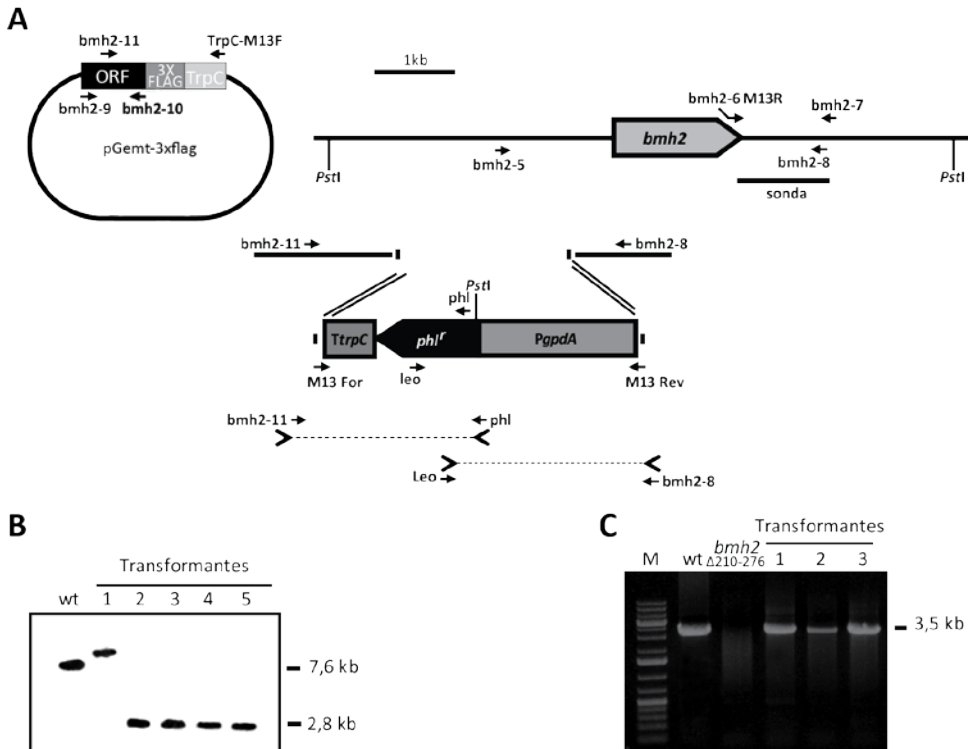


**Figura 33. Interrupción dirigida del gen *bmh1*.** (A) Representación esquemática del locus *bmh1* y del casete de interrupción con el marcador seleccionable obtenido mediante la técnica *Split Marker*. (B) Análisis de los transformantes mediante hibridación *Southern*; ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con *Pst*I, separado en un gel al 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada.

### 3.2.3. Obtención de una versión truncada de la proteína Bmh2

Bmh2 fue identificada en el análisis proteómico como más abundante en el proteoma del mutante nulo *fbp1*. Con el fin de detectar la proteína Bmh2 por *Western Blot* y realizar inmunoprecipitación para estudiar su nivel de ubiquitinación, se llevó a cabo el marcaje de la proteína con el epítipo 3XFLAG, tanto en un fondo silvestre como en un fondo  $\Delta fbp1$ .

La construcción se realizó a partir del vector pGemT-3XFLAG (cedido por el Dr. Turrá) que contiene el epítipo 3XFLAG fusionado al terminador del triptófano (figura 34A). La ORF del gen *bmh2*, amplificada con *bmh2-9* y *bmh2-10N*, se clonó en fase con el epítipo 3XFLAG. La construcción resultante se amplificó con los cebadores *bmh2-9* y *TrpC-M13F* obteniéndose una de las regiones flanqueantes que se fusionaron con el 75% del marcador de resistencia a fleomicina ( $Phle^R$ ). En la figura 34A se muestra el esquema para la obtención de los transformantes mediante la técnica *Split Marker*.



**Figura 34. Marcaje de la proteína Bmh2 con 3XFLAG. (A)** Representación esquemática del locus *bmh2*, del vector pGemt portador del 3xflag y del casete de interrupción con el marcador seleccionable obtenido mediante la técnica *Split Marker*. **(B)** Análisis de los transformantes mediante hibridación *Southern*; ADNg de la cepa silvestre y de los distintos transformantes fue tratado con *PstI*, separado en un gel al 0,7% agarosa, transferido a una membrana de nailon e hibridado con la sonda indicada. Los carriles 1 y 2 son transformantes *bmh2* $_{\Delta 210-266}$  construidos sobre un fondo silvestre y los carriles 3, 4 y 5 transformantes *bmh2* $_{\Delta 210-266}$  construidos sobre un fondo *Δfbp1*. **(C)** Análisis de tres complementados independientes (sobre fondo wt) mediante PCR usando los cebadores *bmh2-5* y *bmh2-8*.

Los transformantes obtenidos se analizaron mediante *Southern*, digiriendo el ADNg con la enzima *PstI* e hibridando con una sonda (amplificada con *bmh2-6M13R* y *bmh2-7*) de la región 3' (figura 34A). En cuatro de los transformantes analizados, la banda de 7,6 kb esperada en la estirpe silvestre fue reemplazada por otra de 2,8 kb, presentando así el patrón de bandas esperado para un recombinante homólogo (figura 34B).

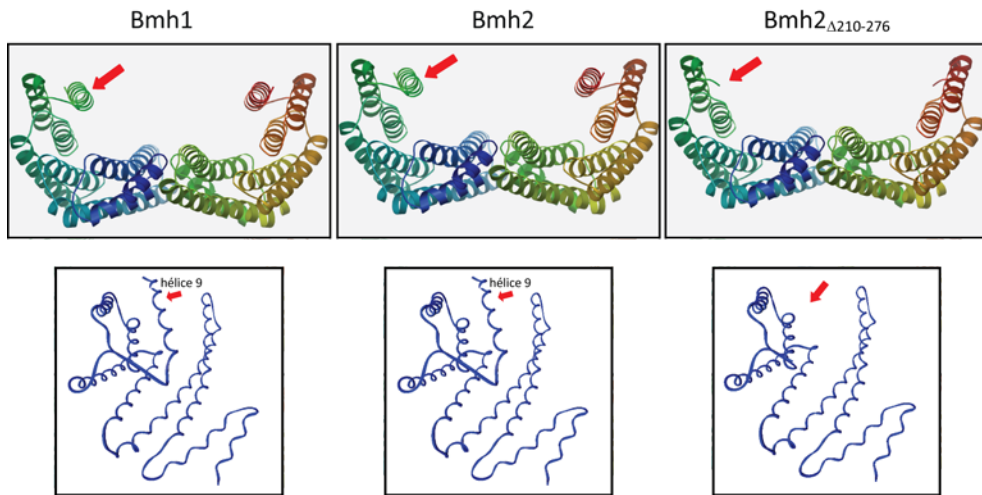
Con el fin de comprobar que los recombinantes homólogos contenían efectivamente la secuencia del gen *bmh2::3XFLAG* se amplificó sobre ADN genómico de los recombinantes tanto en el fondo silvestre como mutante y mediante PCR, el fragmento comprendido entre los cebadores *bmh2-8* y *bmh2-9*. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados. La secuenciación reveló la existencia de un error en

la base de datos ocasionando un desfase en la secuencia introducida en la construcción. Por ello, la fusión *bmh2::3XFLAG* presentó un desfase que dió lugar a una versión truncada de la proteína, que probablemente sería no funcional y no mantenía el epítipo 3XFLAG. Sin embargo, como consecuencia de la mutación generada, se obtuvo un mutante *bmh2* <sub>$\Delta$ 210-276</sub> tanto en el fondo silvestre como en el mutante  *$\Delta$ fbp1*.

La complementación de la mutación *bmh2* <sub>$\Delta$ 210-276</sub> se realizó mediante cotransformación de protoplastos de la estirpe mutante con el casete de resistencia a higromicina (Hyg<sup>R</sup>) y el alelo silvestre *bmh2* amplificado con los cebadores *bmh2-5* y *bmh2-8*. La comprobación de los transformantes obtenidos por PCR, mostró que todos ellos presentaban un fragmento del tamaño deseado, a diferencia del mutante donde no existía amplificación (figura 34C).

### **3.3. Estructura tridimensional de proteínas Bmh1/2 en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Utilizando las secuencias aminoacídicas deducidas para las proteínas Bmh1, Bmh2 y la versión truncada Bmh2, se generaron modelos tridimensionales teóricos de estas tres proteínas con la herramienta PSIPRED disponible en el servidor *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) (figura 35). Las estructuras secundarias de las dos proteínas Bmh1/2 fueron idénticas entre sí, mientras que en la versión truncada se observó claramente la falta de la hélice 9, lo cual afectará muy probablemente a la funcionalidad de esta proteína.



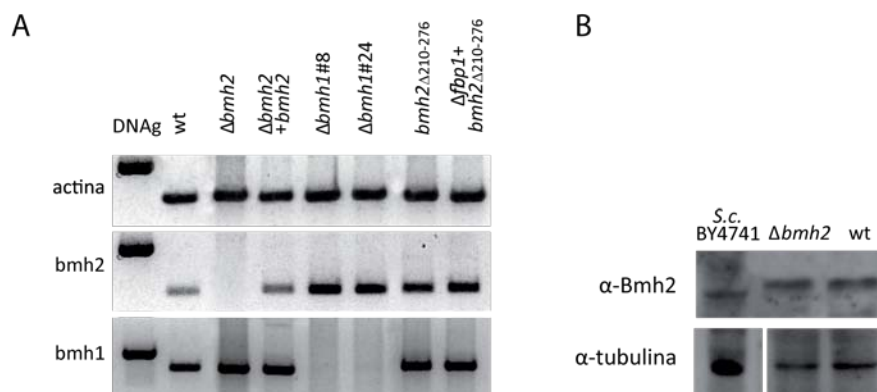
**Figura 35. Modelo tridimensional teórico de las proteínas Bmh1/2 de *F. oxysporum*.** En el panel superior se muestra la estructura tridimensional, en forma de dímeros, de las proteínas Bmh1, Bmh2 y la versión truncada de Bmh2 en la que se indica la ausencia de la hélice 9. En la panel inferior, se representan las formas monoméricas de las tres proteínas con las nueve hélices bien diferenciadas, salvo en la versión truncada. Los modelos tridimensionales se han generado usando el servidor Swiss-Model.

### 3.4. Expresión de las proteínas Bmh1/2 en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

La expresión de los genes Bmh1/2 en levaduras presenta diferentes niveles de regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (van Heusden & Steensma, 2006).

Para estudiar la expresión de los genes *bmh1* y *bmh2* se llevó a cabo RT-PCR a tiempo final. Para ello se sintetizó ADNc a partir de ARN extraído de cultivos crecidos 72 horas en medio rico (PDB) (figura 36A). Los niveles de transcrito del gen *bmh2* indicaron una mayor expresión en los mutantes  $\Delta$ *bmh1* y en las estirpes truncadas en comparación con la cepa silvestre. En el primer caso, es posible que la ausencia del gen *bmh1* sea compensada con una mayor expresión del gen *bmh2*. En el caso de las cepas truncadas, la mayor expresión de *bmh2* podría deberse a una mayor estabilidad de los transcritos, probablemente como consecuencia de presentar un terminador heterólogo (terminador TrpC de *Aspergillus*). Los niveles de transcrito del gen *bmh1* se mantuvieron constantes en todas las cepas analizadas y su expresión fué mayor que la del gen *bmh2* en la estirpe silvestre.

Para estudiar la expresión de Bmh1/2 a nivel de proteína se realizó un *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-Bmh2 de levaduras (Abnova). La figura 36B muestra la detección de ambas proteínas 14-3-3 en las distintas estirpes ya que el anticuerpo presentó reactividad tanto con Bmh1 como con Bmh2. La banda presente en el carril correspondiente a la cepa  $\Delta bmh2$  pertenece a Bmh1. Debido a que ambas proteínas tienen un peso molecular de aproximadamente 30KDa (Moore & Perez, 1967) es difícil separar las bandas correspondientes a cada una. Se utilizó como control positivo extracto proteico crudo de la estirpe BY4741 de *S. cerevisiae* (proteínas cedidas por el Dr. Rito Humberto Herrera).



**Figura 36. Expresión de *bmh1* y *bmh2*.** (A) Esporas de las cepas indicadas se crecieron 72 horas en PDB. El análisis de expresión se realizó por RT-PCR a tiempo final. (B) Proteínas totales de las cepas indicadas de *F. oxysporum* germinadas 15 horas en PDB y transferidas a placas de MMP durante 8h se usaron para realizar análisis *Western blot* con el anticuerpo anti-Bmh2 que detecta las proteínas 14-3-3. Como control de carga se usó el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -tubulina. S.c., *Saccharomyces cerevisiae*.

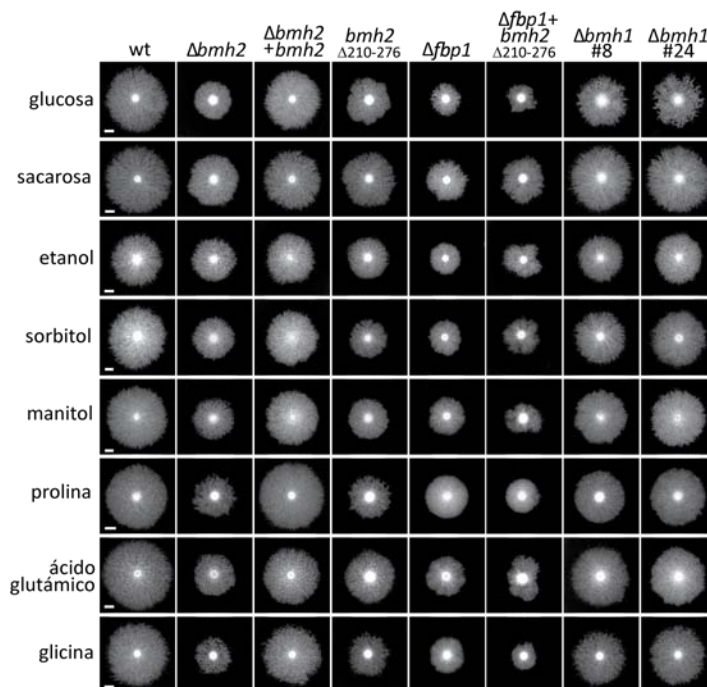
### 3.5. El mutante $\Delta bmh2$ está afectado en la utilización de nutrientes

Las proteínas 14-3-3 están involucradas en multitud de procesos celulares, para entender el papel de Bmh1 y Bmh2 en dichos procesos, se llevó a cabo una caracterización fenotípica de los mutantes  $\Delta bmh1$  y  $\Delta bmh2$ .

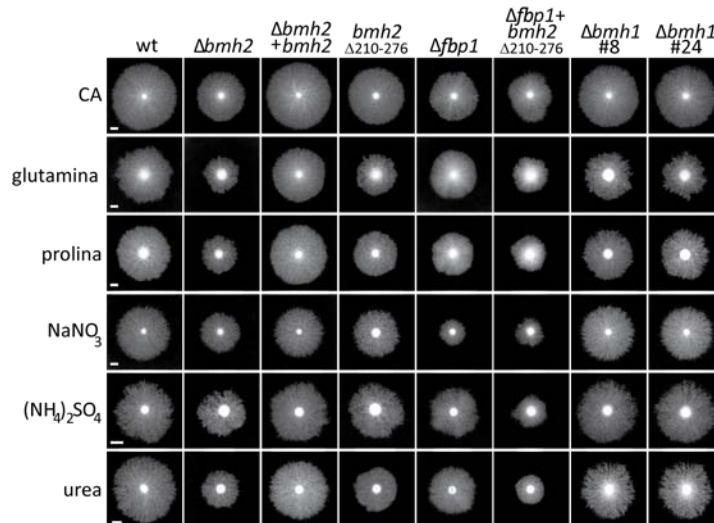
Uno de los procesos en los que las proteínas 14-3-3 juegan un papel muy importante es en la utilización y transporte de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Bruckmann et al, 2007; Ichimura et al, 2004). Para investigar si las estirpes  $\Delta bmh1$  y  $\Delta bmh2$  estaban afectadas en estos procesos se analizó el crecimiento de las

distintas cepas en placas de medio mínimo con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno al 1% que se escanearon tras 4 días de crecimiento a 28°C (figura 37 y 38).

El mutante  $\Delta bmh2$  exhibió una reducción muy significativa en el radio de la colonia respecto de la cepa silvestre en todas las fuentes de carbono y nitrógeno analizadas, mientras que el mutante  $\Delta bmh1$  presentó un crecimiento muy similar al de la cepa silvestre, excepto en glucosa. El fenotipo de la cepa truncada fue muy similar al del mutante  $\Delta bmh2$ , lo que indica que la  $\alpha$ -hélice 9 es importante para la funcionalidad de la proteína. Uno de los dominios significativos de unión a ligando está localizado en dicha hélice, donde los aminoácidos L218, L222, N226, L229 y W230 se encuentran muy conservados en las proteínas 14-3-3 (Tzivion et al, 2001). La mutación  $\Delta bmh2$  en el fondo genético  $\Delta fbp1$  presentó un efectivo aditivo de ambas mutaciones, indicando que Fbp1 y Bmh2 están implicadas en en dos vías distintas para la asimilación de nutrientes (figuras 37 y 38).



**Figura 37. Efecto de la delección de *bmh2* y *bmh1* en la utilización de fuentes de carbono.**  $2 \times 10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron durante 4 días a 28°C en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono al 1%. Escala 5 mm.



**Figura 38. Efecto de la delección de *bmh2* y *bmh1* en la utilización de fuentes de nitrógeno.**  $2 \times 10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron durante 4 días a 28°C en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno al 1%. CA, casaminoácidos. Escala, 5 mm.

Estos datos en conjunto nos sugieren que Bmh2 pero no Bmh1 puede tener un papel en la utilización del carbono y nitrógeno en *F. oxysporum*.

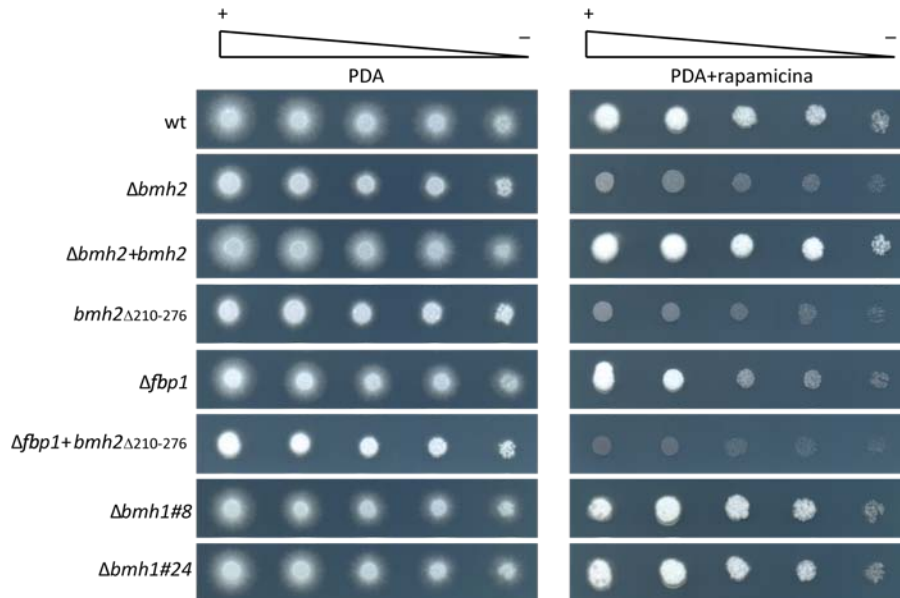
### 3.6. Bmh2 interviene en la vía de sensibilidad a rapamicina

Dado que el mutante  $\Delta$  *bmh2* presentó un crecimiento reducido en distintas fuentes de carbono y nitrógeno, se estudió la implicación de Bmh2 en la ruta de la kinasa Ser/Thr TOR (*target of rapamycin*) responsable del crecimiento celular en eucariotas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (De Virgilio & Loewith, 2006; Rohde et al, 2008). Las proteínas BMH1 y BMH2 de *S. cerevisiae* juegan un papel importante en la ruta TOR (Gelperin et al, 2002; van Heusden & Steensma, 2001) actuando como un componente clave en la señalización de sensibilidad a rapamicina (Bertram et al, 1998), compuesto que actúa como inhibidor de dicha ruta. Para investigar si Bmh2 presentaba una función similar como regulador positivo, se analizó el efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de las distintas estirpes en medio PDA.

El mutante  $\Delta$  *bmh2* presentó hipersensibilidad a rapamicina, restaurándose el fenotipo en la cepa complementada, sin embargo el mutante *bmh1* mostró un crecimiento similar al de la cepa silvestre. De nuevo la ausencia de la  $\alpha$ -hélice 9 en la estirpe *bmh2* <sub>$\Delta$ 210-276</sub> tuvo el mismo efecto que la ausencia de la proteína completa en el



mutante nulo. El mutante  $\Delta fbp1$  mostró una sensibilidad a rapamicina algo mayor que la cepa silvestre y la doble mutación  $bmh2_{\Delta 210-276} \Delta fbp1$  ocasionó una sensibilidad incrementada, lo que indica que tanto Fbp1 como Bmh2 serían reguladores positivos de la ruta de señalización por nutrientes TOR (figura 39).



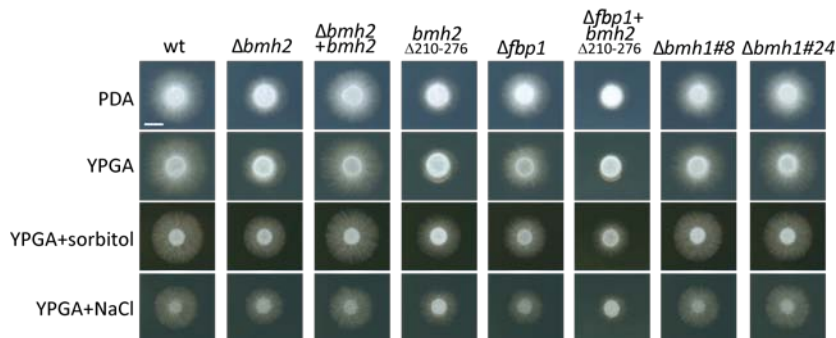
**Figura 39. La delección de *bmh2* aumenta la sensibilidad a rapamicina.** Diluciones seriadas de las cepas indicadas de  $10^4$  a  $10^2$  esporas frescas se inocularon en medio rico PDA o en PDA suplementado con 50  $\mu\text{g/mL}$  de rapamicina. Las placas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 36 y 96 horas, respectivamente.

### 3.7. Bmh2 está implicada en morfogénesis y crecimiento invasivo

Una vez analizado el crecimiento del mutante  $\Delta bmh2$  en medio mínimo y viendo que estaba seriamente afectado se estudió el efecto de dicha mutación sobre el desarrollo de la colonia en medio rico. En *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica* los mutantes para el gen BMH1 están afectados en su capacidad para el crecimiento filamentosos pero no para el crecimiento invasivo (Cognetti et al, 2002; Hurtado & Rachubinski, 2002; Palmer et al, 2004). Para evaluar el papel de Bmh1 y Bmh2 en *F. oxysporum* en relación a la filamentación, las cepas a ensayar se crecieron en medio sólido PDA e YPGA.

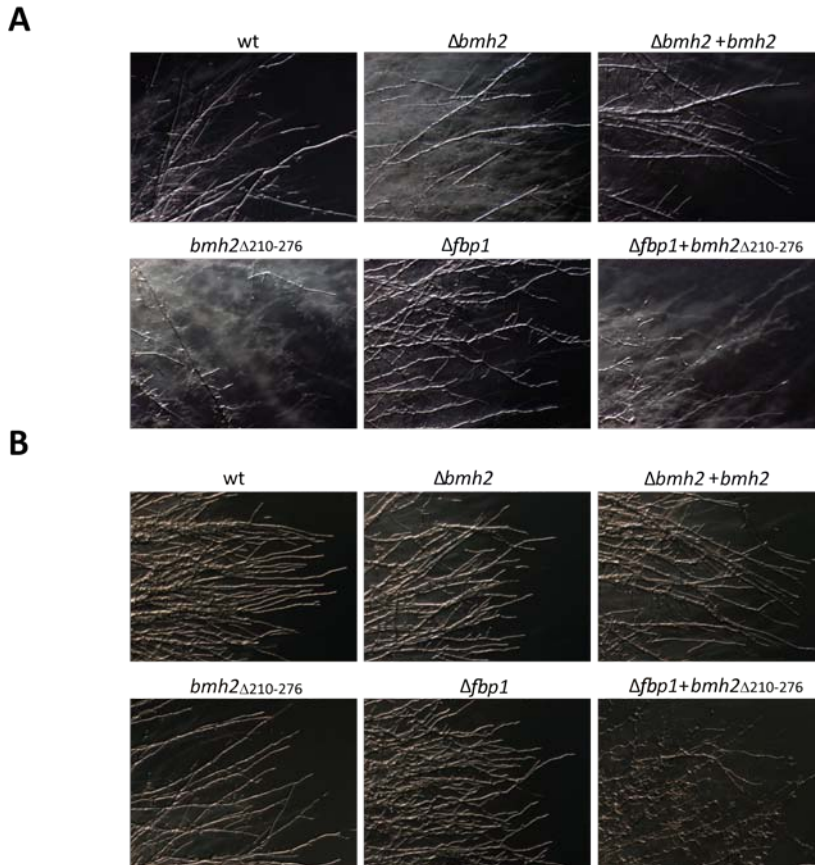
El mutante  $\Delta bmh2$  presentó una reducción muy significativa en la filamentación, mientras que el mutante  $\Delta bmh1$  exhibió una colonia cuya morfología fué igual a la de

la cepa silvestre. La mutación *bmh2*<sub>Δ210-276</sub> originó un desarrollo de la colonia similar a la del mutante *Δbhm2*, disminuyendo la filamentación en la misma. El doble mutante *Δfbp1bhm2*<sub>Δ210-276</sub> mostró un nivel de filamentación aún menor que la cepa *bmh2*<sub>Δ210-276</sub> (figura 40, paneles superiores). La adición de dos estabilizadores osmóticos como el sorbitol y el cloruro de sodio recuperó la filamentación en aquellas estirpes afectadas pero no el radio de crecimiento (figura 40, paneles inferiores).



**Figura 40. Efecto del sorbitol y NaCl en la morfología de los mutantes  $\Delta$  *bmh2*.**  $10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron en medio rico PDA, YPGA, YPGA con 1,25M sorbitol e YPGA con 1,5M NaCl. Las placas se incubaron a 28°C y fueron escaneadas a las 44 horas de crecimiento. Escala, 5 mm.

Para continuar analizando el papel de las proteínas Bmh1/2 de *F. oxysporum* en el fenotipo de filamentación se analizó a nivel microscópico el borde de las distintas colonias. En la figura 41A el mutante *Δbhm2* mostró un micelio que en su mayor parte penetra en el agar, de ahí la falta de enfoque de la imagen. Los mutantes *bmh1* no están incluidos en este ensayo puesto que presentaron un patrón de filamentación igual al de la cepa silvestre. El mutante *bmh2*<sub>Δ210-276</sub> exhibió un fenotipo *Δ bhm2*, creciendo más hacia el interior del medio y menos en superficie. Finalmente, la mutación *bmh2*<sub>Δ210-276</sub> sobre el fondo genético *Δ fbp1* presentó un fenotipo de crecimiento como el del mutante *bmh2*<sub>Δ210-276</sub>, aunque el radio de la colonia fue aun menor. En presencia de sorbitol se recuperó la filamentación en superficie de todas las estirpes (figura 41B).



**Figura 41. Efecto del sorbitol en la morfología de la colonia.**  $5 \times 10^4$  esporas frescas de las distintas cepas se crecieron en medio rico YPGA **(A)** e YPGA suplementado con 1,25M sorbitol **(B)** durante 48 horas a 28°C. Las imágenes, tomadas con un microscopio binocular Zeiss, muestran el fenotipo de crecimiento del borde de la colonia fúngica (80X).

El crecimiento observado indicaba una mayor invasión del agar en los mutantes *bmh2* que la cepa silvestre.

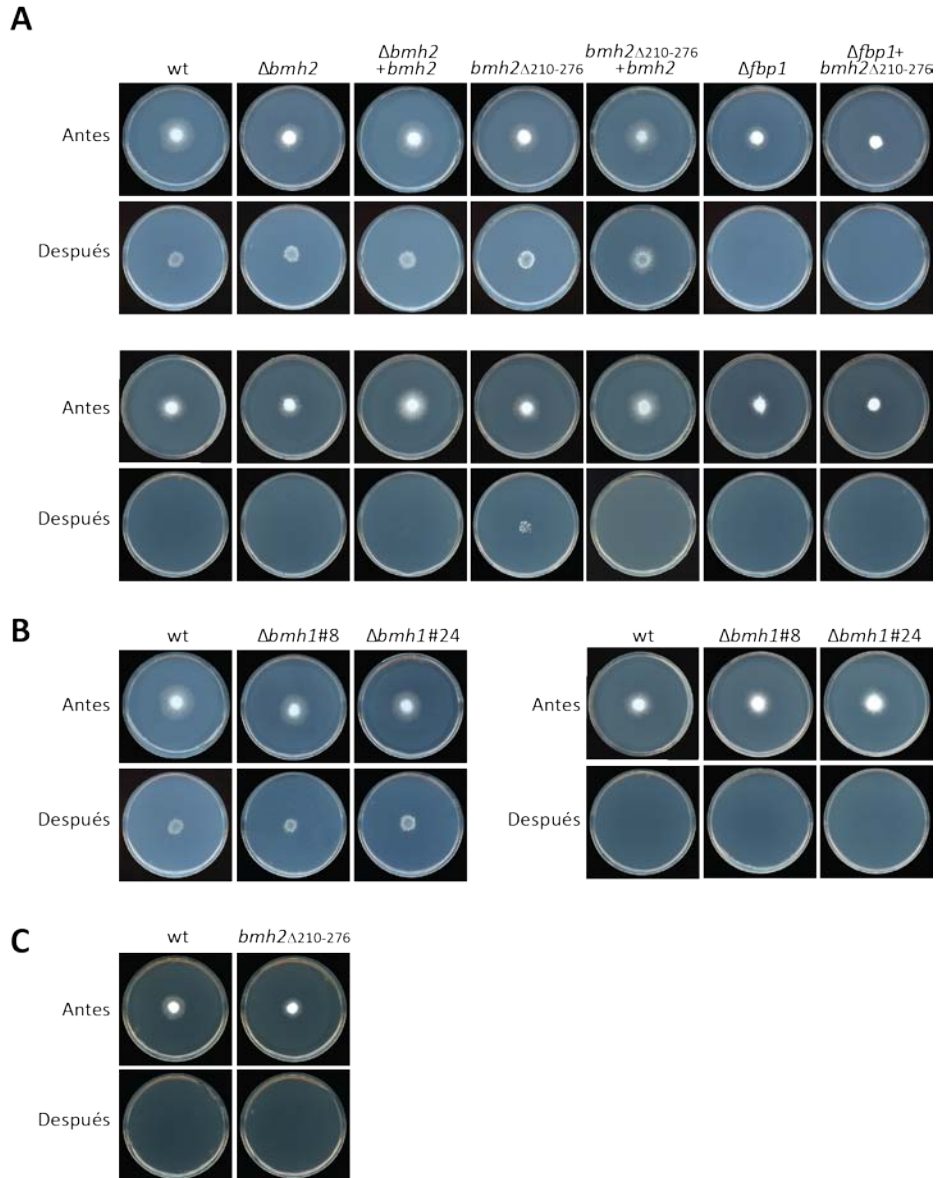
Para comprobar si estos mutantes estaban afectados en el crecimiento invasivo, descrito en el apartado 1, donde se identificó al mutante nulo *fbp1* incapaz de penetrar el agar, se realizó el ensayo de penetración del celofán (Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Estudios previos han demostrado que el crecimiento invasivo en *Fusarium* es un proceso fuertemente regulado por la fuente de nitrógeno, siendo reprimido por amonio (López-Berges et al, 2010).

En presencia de nitrato sódico (figura 42A panel superior y figura 42B panel izquierdo) los mutantes  $\Delta bmh1$ ,  $\Delta bmh2$  y  $bmh2_{\Delta 210-276}$  presentaron un comportamiento silvestre y fueron capaces de atravesar de manera eficiente la

membrana de celofán. Sin embargo, la mutación  $\Delta fbp1$ , como ya se indicó en el apartado 1 de los resultados, causó la incapacidad para atravesar el celofán e invadir el sustrato, no solo de la cepa  $\Delta fbp1$  sino que también de la doble mutante  $\Delta fbp1 bmh2_{\Delta 210-276}$ . En presencia de amonio (figura 42A panel inferior y figura 42B panel derecho) la penetración del celofán se reprimió en todas las cepas analizadas excepto en el mutante  $bmh2_{\Delta 210-276}$ , que fue capaz de atravesar la membrana de celofán e invadir el sustrato. La adición de 1,25M de sorbitol al medio, como estabilizador osmótico, recuperó la inhibición del crecimiento invasivo en presencia de amonio en la cepa  $bmh2_{\Delta 210-276}$  (figura 42C), hecho que ya había sido mostrado en estirpes mutantes afectadas en el metabolismo del nitrógeno (López-Berges et al, 2010).

Estos resultados en conjunto nos sugieren que Bmh2, pero no Bmh1, es esencial para la morfogénesis y filamentación de la colonia de *F. oxysporum*, no así para el crecimiento invasivo. Sorprendentemente, la  $\alpha$ -hélice 9 de Bmh2 tiene un papel crucial en la represión del crecimiento invasivo por amonio, ya que la eliminación de dicho dominio permitió la penetración de *Fusarium* a través del celofán y por tanto crecimiento una vez retirado el mismo.

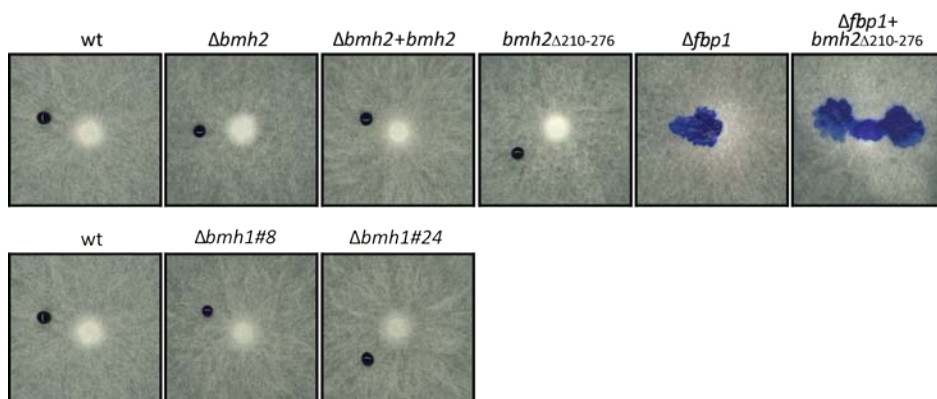
Como se demostró en el apartado 1 de Resultados, Fbp1 es esencial para el crecimiento invasivo. Los resultados aquí presentados indican que la mutación  $fbp1$  tiene un efecto dominante sobre la mutación  $bmh2_{\Delta 210-276}$ , ya que los dobles mutantes presentaron el fenotipo de no invasión del agar.



**Figura 42. La represión del crecimiento invasivo por amonio está regulada por *bmh2*.** (A)  $5 \times 10^4$  esporas frescas de las estirpes indicadas se inocularon en placas de medio mínimo suplementado con 50 mM de  $\text{NaNO}_3$  (panel superior) o 50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (panel inferior), cubiertas con una membrana de celofán y se inocularon a  $28^\circ\text{C}$  durante 3 días (antes). El celofán con la colonia fúngica se retiró y las placas se incubaron un día más para detectar la presencia del hongo en el medio (después). (B) La penetración de celofán se determinó en medio mínimo suplementado con 50 mM de  $\text{NaNO}_3$  (panel de la izquierda) o 50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (panel de la derecha). (C) La penetración de celofán se determinó en medio mínimo suplementado con 50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 1,25M de sorbitol.

### 3.8. Las mutaciones $\Delta bmh1$ y $\Delta bmh2$ no afectan a la hidrofobicidad de la colonia

Dado que la formación del micelio aéreo está muy relacionado con la hidrofobicidad de la colonia y que, como se vió en el apartado 1, Fbp1 juega un papel importante en la misma, se investigó el papel de los genes *bmh1* y *bmh2* en este fenotipo. Para ello se colocaron gotas de agua teñidas sobre el micelio de las diferentes estirpes a ensayar. Al cabo de 24 horas las gotas depositadas sobre las estirpes  $\Delta bmh1$ ,  $\Delta bmh2$  y *bmh2* $_{\Delta 210-276}$  se mantuvieron intactas, sugiriendo que la superficie es altamente hidrofóbica, como en la estirpe silvestre. Por el contrario, en el mutante  $\Delta fbp1$  *bmh2* $_{\Delta 210-276}$  la gota fue rápidamente absorbida. De nuevo, el efecto de la mutación *fbp1* predominó sobre el fenotipo que proporciona la proteína Bmh2 truncada no existiendo ningún efecto sinérgico entre ambos. (figura 43).



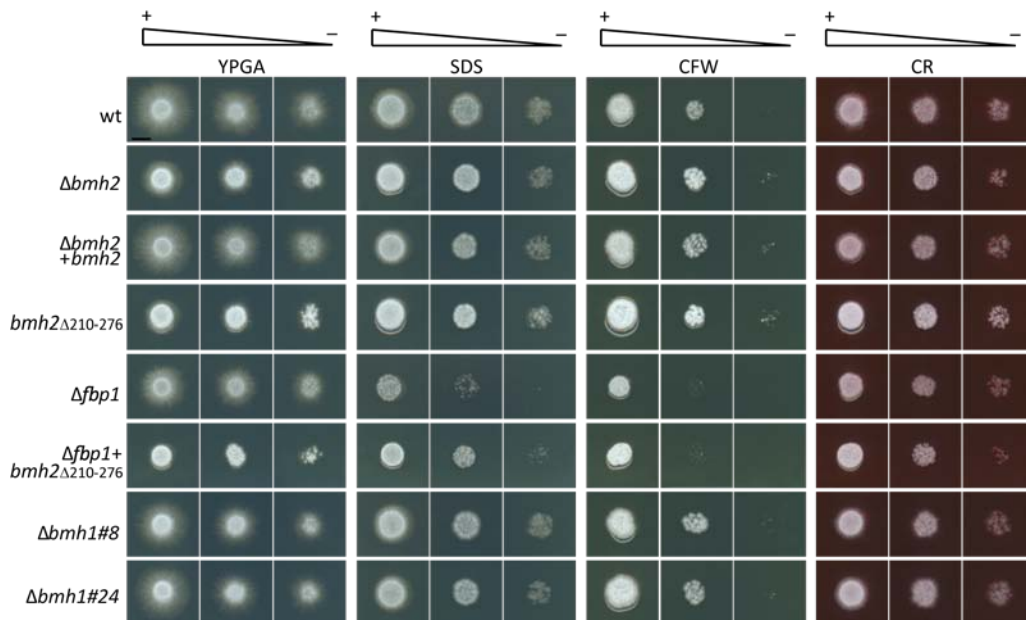
**Figura 43. Carácter hidrofóbico de los mutantes  $\Delta bmh1$  y  $\Delta bmh2$ .**  $2 \times 10^4$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron en medio mínimo con un 3% de sacarosa y se incubaron a 28°C. Después de 6 días de crecimiento se depositó una gota de 20  $\mu$ L de agua teñida de azul sobre las colonias. La foto fue tomada justo inmediatamente tras colocar la gota.

### 3.9. Bmh2 incrementa la resistencia a estrés térmico pero no está implicada en la vía de integridad celular

Las proteínas 14-3-3 son reguladores moleculares que intervienen en múltiples procesos celulares, de ahí que las mutaciones en estos genes den lugar a fenotipos pleiotrópicos en muchos casos. Uno de los procesos en los que interviene BMH1 en *S. cerevisiae* es la vía de integridad celular ya que mutantes en este gen presentan sensibilidad a compuestos que afectan a la misma (Lottersberger et al, 2006). Para investigar si Bmh1 o Bmh2 también tienen un papel en la integridad celular de *F.*

*oxysporum* se evaluó el crecimiento de las distintas cepas en medio rico YPGA que contenía dodecil sulfato sódico (SDS, 0,0125%), blanco de calcoflúor (CFW, 50µg/mL) o rojo congo (CR, 100 µg/mL), compuestos desestabilizadores de la pared (CFW y CR) y de la membrana celular (SDS).

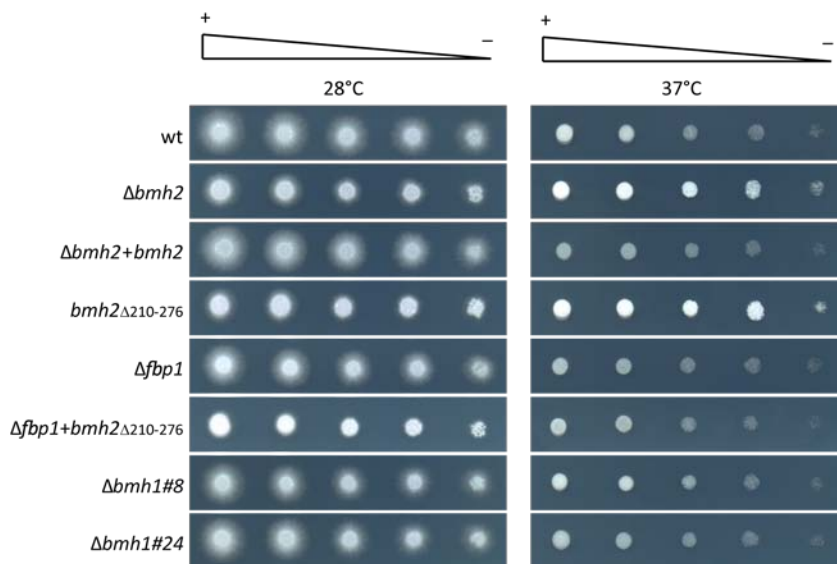
Los mutantes  $\Delta bmh1$ ,  $\Delta bmh2$  y  $bmh2_{\Delta 210-276}$  no presentaron sensibilidad a ninguno de los compuestos ensayados mostrando un crecimiento como el de la cepa silvestre. La mutación  $bmh2_{\Delta 210-276}$  en el fondo genético  $\Delta fbp1$  presentó una sensibilidad como la de la cepa  $\Delta fbp1$ , a excepción del compuesto SDS donde presentó una mayor resistencia (figura 44). En este caso la mutación  $bmh2_{\Delta 210-276}$  presentó dominancia sobre la mutación  $\Delta fbp1$ .



**Figura 44. Efecto de los distintos tipos de estrés sobre las mutaciones  $\Delta bmi$  y  $\Delta bhm2$ .** Esporas frescas de las cepas indicadas se inocularon de forma seriada desde  $10^4$  a  $10^2$  esporas en placas de medio rico YPGA con SDS (0,0125%), CFW (50µg/mL) ó CR (100µg/mL). Las placas se incubaron a 28°C y fueron escaneadas a las 44 horas de crecimiento excepto el tratamiento con CFW que fue escaneado a las 72 horas. Escala, 5 mm.

Otro proceso en el que está implicada BMH1 en levaduras, es en la resistencia a estrés térmico (Wang et al, 2009). Para ver si los mutantes de *F. oxysporum* están implicados en este fenotipo se crecieron las distintas cepas en medio rico PDA a 37°C.

El mutante  $\Delta bmh2$  presentó resistencia térmica frente a la estirpe silvestre y complementada. Como en los procesos analizados anteriormente, el mutante  $\Delta bmh1$  exhibió sensibilidad a la temperatura similar a la estirpe silvestre. Por otro lado, la mutación  $bmh2_{\Delta 210-276}$  mostró el mismo fenotipo de resistencia que el mutante  $\Delta bmh2$ , mientras que esta mutación en el fondo genético  $\Delta fbp1$  presentó sensibilidad a la temperatura al igual que la cepa  $\Delta fbp1$ , lo que nos indica que en este fenotipo no existe un efecto sinérgico de ambas mutaciones dominando la mutación  $\Delta fbp1$  sobre  $bmh2_{\Delta 210-276}$  (figura 45).



**Figura 45. La mutación  $\Delta bmh2$  confiere resistencia a altas temperaturas.** Diluciones seriadas de  $10^4$  a  $10^2$  esporas frescas de las cepas indicadas se crecieron en medio rico PDA. Los controles se incubaron a 28 °C 48 horas (paneles de la izquierda) y a 28°C 12 horas y 37°C 96 horas los tratamientos (paneles de la derecha).

Estos resultados en conjunto nos sugieren que las proteínas Bmh1/2 de *F. oxysporum* no están implicadas en la vía de integridad celular, sin embargo Bmh2 participa en el incremento de la viabilidad celular en respuesta a estrés térmico.

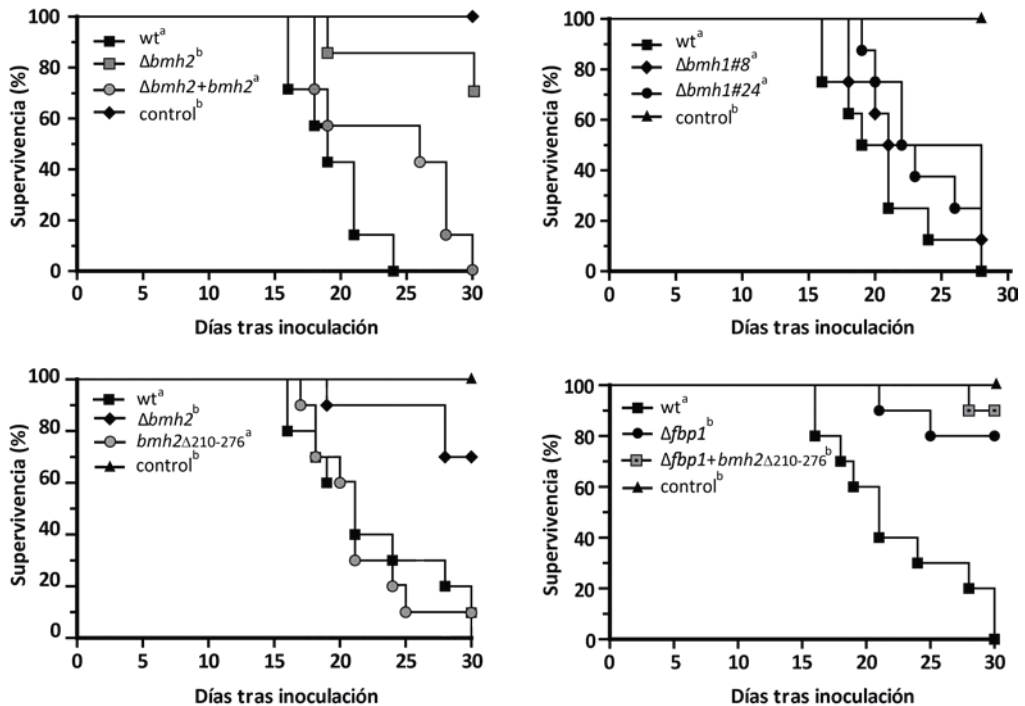
### 3.10. Bmh2 contribuye a la virulencia de *F. oxysporum*

Para determinar el papel de las proteínas Bmh1/2 de *F. oxysporum* durante el proceso patogénico, se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate del cultivar *Money Maker*. Las raíces de plántulas de 14 días de edad se sumergieron durante 30 minutos en suspensiones de esporas de las distintas cepas a ensayar.



La evolución de la enfermedad en las plantas se evaluó como el porcentaje de supervivencia tras 30 días post-infección y usando el método Kaplan-Meier, que permite comparar de forma simplificada la virulencia de las estirpes (Lopez-Berges et al, 2012) (figura 46). En cada ensayo se utilizaron 10 plantas por estirpe y se repitieron tres veces con resultados similares.

Las plantas inoculadas con la estirpe silvestre presentaron los síntomas característicos de la marchitez vascular diez días después de la inoculación. La severidad de los síntomas se incrementó a lo largo del tiempo y la mayoría de las plantas habían muerto veintitrés días tras la inoculación. De igual forma, la mayor parte de las plantas inoculadas con los mutantes  $\Delta bmh1$  y  $bmh2_{\Delta 210-276}$  se encontraban muertas tras veinticinco días de infección ( $P= 0,0889$  y  $P=0,7211$ , respectivamente). Por el contrario, las plantas inoculadas con la estirpe  $\Delta bmh2$  mostraron más de un 80% de supervivencia ( $P= 0,0015$ ) tras 25 días y las inoculadas con  $\Delta fbp1bmh2_{\Delta 210-276}$  un 100% ( $P<0,0001$ ). Los resultados aquí presentados indican, que al igual que en la invasión del agar, el fenotipo presentado por la mutación  $\Delta fbp1$  muestra efecto dominante sobre el fenotipo de la estirpe  $bmh2_{\Delta 210-276}$ . Las diferencias observadas en el comportamiento patotípico de las estirpes  $\Delta bmh2$  y  $bmh2_{\Delta 210-276}$  sugieren que el dominio de unión al ligando en la  $\alpha$ -hélice 9 no es esencial para la infección.



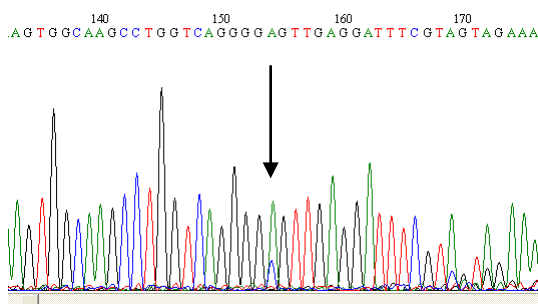
**Figura 46. *bhm2* pero no *bhm1* interviene en la patogénesis de *F. oxysporum*.** Las gráficas muestran el índice de supervivencia de plantas de tomate (cv MoneyMaker) inoculadas con las cepas indicadas de *Fusarium*. En todos los casos se utilizaron como control plantas no inoculadas. El ensayo se llevó a cabo al menos tres veces con resultados similares. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Cepas con la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test Mantel-Cox, con un  $p < 0,005$ .

### 3.11. Complementación de $\Delta bhm2$ con un alelo *bhm1A188S*

Los resultados presentados hasta ahora indican que Bmh1 y Bmh2 tienen funciones diferentes en todos los procesos estudiados. Cuando se comparó la secuencia de ambas proteínas, se observó que, si bien ambas proteínas presentan un 73% de similitud solamente, los aminoácidos correspondientes a los dominios de dimerización y de unión a ligando están conservados, y todas las  $\alpha$ -hélices conservan casi el 100% de identidad, con la excepción de las  $\alpha$ -hélice 4 y 6. La funcionalidad de las proteínas 14-3-3 y dentro de ellas BMH1/2 de *S. cerevisiae* y Rad24/Rad25 de *S. pombe* está asociada a la fosforilación de determinadas serinas conservadas. Tal es el caso de la S189 de *S. pombe* implicada en respuesta a daño en el ADN (Grandin & Charbonneau, 2008). La comparación de la secuencia de Bmh1 y Bmh2 de *Fusarium* reveló que Bmh2 presenta dicha serina en la posición 188 pero Bmh1 tiene en su lugar

una alanina. Con el fin de estudiar si la mutación *bmh2* podía ser complementada con un alelo *bmh1* con serina en lugar de alanina en la posición 188, se llevó a cabo mutagénesis dirigida sobre la secuencia del gen *bmh1*.

Mediante PCR sobre ADNg de la cepa silvestre, se amplificaron dos fragmentos del gen *bmh1*, creando la mutación A188S mediante PCR de fusión (Carroll et al, 1994). Dicho fragmento amplificado se utilizó para co-transformar a la estirpe  $\Delta$ *bmh2* junto con el casete fleomicina. Se identificaron varios transformantes que presentaron un fenotipo de crecimiento más parecido al silvestre. Se aisló el ADN de algunos de ellos y se secuenció la región mutada, comprobándose que tres de ellos habían incorporado la mutación, si bien mantenían la copia silvestre del gen *bmh1* (figura 47).



**Figura 47. Fluorograma transformante  $\Delta$ *bmh2*/*bmh1*A188S.** El fluorograma muestra el cambio de nucleótido y la presencia de los dos alelos, el silvestre y el introducido.

Se analizó la recuperación del fenotipo silvestre en las estirpes complementadas con el alelo *bmh1*A188S. En ninguno de los fenotipos estudiados se recuperó el comportamiento de la cepa silvestre. Sin embargo, la infección de plantas con dos estirpes  $\Delta$ *bmh2* complementadas con el alelo *bmh1*A188S mostró síntomas de infección similares a los de la estirpe *bmh2* <sub>$\Delta$ 210-276</sub> (datos preliminares, no mostrados).

Conforme con estos resultados preliminares, la presencia de la S188 podría ser importante para la virulencia del hongo, extremo que habría que analizar mediante la mutación puntual de la S188 de *Bmh2* en en la cepa silvestre.

**Discusión**



El trabajo expuesto en esta memoria se ha centrado en dilucidar el papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 de *Fusarium oxysporum*. Dado que tanto la proteína Fbp1 (F-box) como la proteína Bmh2 (14-3-3) son reguladores de multitud de procesos celulares, conservados en eucariotas, la eliminación de uno u otro gen presumiblemente tendrá efectos pleiotrópicos con fenotipos diversos.

La rápida y específica degradación de proteínas por el sistema proteosoma-ubiquitina ha emergido como un importante mecanismo de regulación en eucariotas (Hershko & Ciechanover, 1998). Algunos de los procesos básicos celulares regulados por proteólisis dependiente de ubiquitina incluyen la progresión del ciclo celular, iniciación de la transcripción o transducción de señales (Petroski & Deshaies, 2005).

Las proteínas 14-3-3 son capaces de interactuar con multitud de sustratos, preferiblemente fosforilados, por lo que intervienen en multitud de procesos celulares. Sus mecanismos de acción son muy variados, pudiendo actuar como activadores, represores, señales de localización sub-celular, etc. (van Heusden, 2005; van Heusden, 2009; van Heusden & Steensma, 2006). Estos reguladores moleculares están ampliamente estudiados en humanos y levaduras pero poco o nada se conoce en hongos filamentosos.

## **1. Fbp1 participa en la infección y en la integridad celular a través de rutas de señalización MAPK**

En este trabajo se ha identificado Fbp1 como una proteína F-box esencial para la virulencia de *F. oxysporum*. Fbp1 comparte similitud estructural y de secuencia con GRR1 de *Saccharomyces cerevisiae*, Grr1 de *Candida albicans* y Fbp1 de *Fusarium graminearum* y *Cryptococcus neoformans*. Como ocurre en otros hongos patógenos de plantas, proteínas ortólogas de GRR1 juegan un papel importante en la patogenicidad fúngica, por lo que la implicación de las proteínas F-box en virulencia parece estar conservada en hongos patógenos.

En *F. graminearum* FBP1 participa en la formación del complejo SCF<sup>Fbp1</sup> que controla la degradación mediada por ubiquitina de proteínas involucradas en la reproducción sexual y virulencia (Han et al, 2007). La proteína Fbp1 del patógeno humano *Cr. neoformans* también contribuye al desarrollo de la enfermedad mediada

por el hongo (Liu et al, 2011). La capacidad reducida para invadir los tejidos del hospedador y la menor virulencia mostrada por el mutante  $\Delta fbp1$  ponen de manifiesto la contribución del sistema SCF<sup>Fbp1</sup> en la patogénesis.

No obstante, no sólo no se conocen las proteínas diana de Fbp1 que participen en el desarrollo de la enfermedad, sino que tampoco se han identificado los mecanismos moleculares relacionados con dicho proceso.

En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, el ensayo de penetración del celofán descrito por Prados-Rosales y Di Pietro (2008) tiene cierta analogía con el ensayo de invasión del agar de *S. cerevisiae* y se correlaciona con el fenotipo de virulencia en plantas de tomate. Tres componentes clave de la cascada de señalización MAPK Fmk1, la proteína trans-membrana de tipo mucina Msb2, la proteína quinasa Fmk1 y el factor de transcripción Ste12 son esenciales para el crecimiento invasivo y la completa virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Di Pietro et al, 2001; Perez-Nadales & Di Pietro, 2011; Rispaill & Di Pietro, 2009). En esta cascada de señalización en la que una MAPKKK (Ste11) fosforila a una MAPKK (Ste7), la fosforilación de Fmk1, el último componente de la cascada, es necesaria para la activación de los factores de transcripción aguas abajo, concretamente Ste12, responsable del crecimiento invasivo. El contacto de *F. oxysporum* con una superficie sólida desencadena una rápida fosforilación de Fmk1 (Perez-Nadales & Di Pietro, 2011) que, como se ha demostrado en este trabajo, requiere de la acción de Fbp1, por lo que podemos colocar a Fbp1 aguas arriba de Fmk1.

Según esto, cualquiera de los componentes de la cascada o bien proteínas que interaccionen con ellos son susceptibles de degradación dirigida por Fbp1. En ese sentido las proteínas Ste50 (FOXG\_11534), Ste11 (FOXG\_09411) y Ste7 (FOXG\_05521) contienen un dominio PEST de señalización para degradación por proteosoma.

La ubiquitinación de proteínas es un importante mecanismo para modular la señalización celular en *S. cerevisiae* (Bao et al, 2004; Chou et al, 2004; 2006; 2008; Molina et al, 2010). En las cascadas de señalización MAPK, la ubiquitinación se observó por primera vez en la ruta de respuesta a feromona, en levaduras (Molina et al, 2010). La ubiquitinación de los receptores Ste2 y Ste3 que operan en esta ruta es necesaria para su endocitosis y posterior degradación en el lisosoma/vacuola (Hicke & Riezman, 1996; Roth et al, 1998). En esta misma vía, la MAPKK Ste11 también está regulada por ubiquitinación (Esch & Errede, 2002).

No obstante, los fenotipos presentados por el mutante *fbp1* apuntan a que la diana de Fbp1 sea un represor de la ruta más que un regulador positivo, ya que la ausencia de Fbp1 causa interrupción de la ruta de señalización y un nivel de fosforilación de Fmk1 muy bajo. Así, las fosfatasa PP2C (Arino et al, 2011; Jiang et al, 2011; Warmka et al, 2001) son buenos candidatos para ser diana de Fbp1 y regular el nivel de fosforilación de Fmk1.

Otra ruta de señalización MAPK muy conservada en hongos es la ruta de integridad celular. En *S. cerevisiae*, la cascada de integridad celular Mpk1/Slt2 es responsable de cambios en la pared celular durante el ciclo celular y en respuesta a varios tipos de estrés como las altas temperaturas y la exposición a metales pesados (Levin, 2005). Algunos genes que se encuentran bajo el control de esta ruta están implicados en la síntesis y modificación de componentes de la pared celular como, glucanos, mananos y quitina (Garcia et al, 2004; Lesage & Bussey, 2006). La sensibilidad incrementada del mutante *fbp1* a compuestos tóxicos que interfieren con la pared celular (CFW) y la membrana plasmática (SDS) indican que Fbp1 es importante para mantener la integridad de la célula, tanto a nivel de membrana como de pared. Nuestros resultados conectan la función de Fbp1 con la cascada de señalización MAPK Mpk1, sugiriendo que esta ruta puede tener múltiples activadores aguas arriba que pueden ser sustratos de Fbp1 para su ubiquitinación, tal y como está descrito en levaduras (Molina et al, 2010). En *C. neoformans* el complejo SCF<sup>Fbp1</sup> regula la sensibilidad a SDS pero no a CFW, es decir, que el efecto de Fbp1 sobre la integridad celular es más específico sobre la membrana celular (Liu et al, 2011; Wang et al, 2011).

Las proteínas diana de Fbp1, y de las proteínas F-box en general, se encuentran fosforiladas en secuencias llamadas “*phosphodegrons*”, que son reconocidas por las proteínas F-box. Las quinasas de la familia caseína quinasa I (CKI) son responsables de la fosforilación de proteínas que van a ser marcadas para degradación. Dos caseína quinasa I en *S. cerevisiae*, Yck1 y Yck2 juegan un papel muy importante en la fosforilación de los sustratos de GRR1 en los que están implicados (Spielewoy et al, 2004). En *C. neoformans*, la caseína quinasa Cck1 está implicada en la fosforilación de Mpk1, interviniendo en la ruta de señalización de integridad celular. La alteración de la membrana celular observada en los mutantes *cck1* está también presente en los mutantes *fbp1* indicando que los sustratos de Fbp1 que intervienen en esa ruta son fosforilados por Cck1 (Wang et al, 2011).



De la misma forma, Fbp1 en *F. oxysporum* interviene en la regulación de proteínas implicadas en el nivel de fosforilación de Mpk1, en presencia de SDS, y por tanto en el mantenimiento de la integridad celular.

## 2. Análisis proteómico

El análisis proteómico realizado en este trabajo ha tenido por objetivo conocer, en condiciones de crecimiento invasivo, el conjunto de proteínas diferencialmente expresadas en el mutante  $\Delta fbp1$ , con el fin de encontrar posibles proteínas diana del complejo SCF<sup>Fbp1</sup>.

Aproximadamente la mitad de las proteínas más abundantes en el mutante  $\Delta fbp1$  están implicadas en una gran cantidad de procesos celulares que son susceptibles de sufrir ubiquitinación: transporte, proteólisis, respuesta a estrés y organización de los componentes celulares.

La poliubiquitinación es una señal que dirige proteínas al proteosoma, donde la ubiquitina es reciclada y la proteína degradada (Hershko & Ciechanover, 1992) No obstante, la ubiquitinación también afecta a otras funciones como la endocitosis (Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Mukhopadhyay & Riezman, 2007), donde la monoubiquitinación es suficiente para la señal de internalización (Galan & Haguenaer-Tsapis, 1997; Terrell et al, 1998) En levaduras y otros hongos, la endocitosis y transporte intracelular son muy importantes para algunas funciones celulares, incluyendo el establecimiento de la polaridad, el crecimiento de la hifa y la virulencia (Atkinson et al, 2002; Dou et al, 2011; Read & Kalkman, 2003; Shaw et al, 2011; Wang & Shen, 2011). El transporte intracelular implica la transferencia de material entre orgánulos, el cuál es mediado por vesículas que emergen de una membrana y se fusionan con otra. Estos procesos son mediados por los complejos COPI (*coat protein complex I*) y COPII (*coat protein complex II*) que median el transporte vesicular en la vía secretora temprana (Cai et al, 2007). El paso final en el tráfico mediado por vesículas es el anclaje y la fusión de la vesícula con la membrana de destino. Esta fusión se cree que ocurre por el apareamiento de proteínas de membrana de la familia SNARE (Chen & Scheller, 2001). En este trabajo hemos mostrado que una de las proteínas abundantes en *fbp1* es Sec28, el ortólogo de la subunidad  $\epsilon$ -COP humana. Por otro lado, la proteína t-SNARE, Sec17, se encuentra

más expresada en la estirpe silvestre, mostrándose un cierto desajuste en la concentración de ambas. En levaduras se ha mostrado que SEC28 y SEC17 están implicadas en la formación de vesículas y la fusión de membranas respectivamente.

Fbp1 podría estar implicada en estos procesos en *F. oxysporum*. La tinción del Spk con FM4-64 indica que las vesículas secretoras que forman esta estructura reciclan las membranas del ápice, implicando la extensión apical (Fischer-Parton et al, 2000). Estudios recientes a cerca de la maquinaria molecular que regula la orientación de las hifas han demostrado que mutantes afectados en los procesos de transporte vesicular presentan hifas con trayectorias de crecimiento anormales o respuestas trópicas atenuadas (Brand & Gow, 2009). Por tanto, nuestros resultados parecen conectar la función de Fbp1 con las rutas de señalización que regulan el transporte intracelular, ya que Fbp1 es necesaria para la correcta formación del Spk y el crecimiento direccional.

Las 41 proteínas diferencialmente expresadas en el análisis proteómico están implicadas en una gran cantidad de procesos celulares, aunque en líneas generales las podemos agrupar en dos grandes grupos: aquellas relacionadas con el metabolismo primario y las relacionadas con los procesos de oxidación-reducción.

GRR1 juega un papel importante en la señalización por glucosa y aminoácidos (Spielewoy et al, 2004). En un análisis proteómico llevado a cabo por Benanti y colaboradores (2007) se identificaron 7 nuevas dianas metabólicas del complejo SCF<sup>GRR1</sup>, entre ellas, dos reguladores de la glicólisis. Estos resultados demostraron que el cambio entre glicólisis y gluconeogénesis estaba regulado por dianas de SCF<sup>GRR1</sup>. Nuestro estudio identificó tres proteínas implicadas en estas rutas metabólicas, dos sobre-expresadas en el mutante  $\Delta fbp1$  (Pdc1 y Adh2) y una sobre-expresada en la cepa silvestre (Eno1).

Dentro de las proteínas sub-expresadas en el mutante y relacionadas con el metabolismo primario encontramos proteínas implicadas en el ciclo del ácido-tricarboxílico, glucólisis, gluconeogénesis, biosíntesis de aminoácidos, etc, por lo que podemos pensar que Fbp1 regula el metabolismo primario y que por tanto el mutante  $\Delta fbp1$  estará afectado en algunas rutas metabólicas. La reducción del crecimiento en todas las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas está acorde con los resultados obtenidos en el análisis proteómico, si bien la pauta de crecimiento en zig-zag de las hifas contribuye al menor radio de las colonias observado en todos los casos.

Por tanto, aunque queda por demostrar si las proteínas identificadas en *F. oxysporum* son ubiquitinadas y reguladas por el proteasoma, nuestros resultados son coherentes con la hipótesis de que las proteínas diferencialmente expresadas en este análisis proteómico son reguladas por Fbp1 y por tanto susceptibles de ser potenciales dianas para ser ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma a través del sistema SCF<sup>Fbp1</sup>.

### 3. Bmh2 versus Bmh1

Aunque en mamíferos y plantas existen muchas isoformas de las proteínas 14-3-3, dos parecen predominar en hongos: BMH1 y BMH2 han sido caracterizadas en *S. cerevisiae* (Gelperin et al, 1995; Heusden et al, 1995) y Rad24 y Rad25 en *Schizosaccharomyces pombe* (Ford et al, 1994). No obstante, de las dos isoformas presentes mayoritariamente en ascomicetos, una sería la ortóloga de BMH1/2 y la otra ha debido aparecer evolutivamente en la separación de los ascomicetos multicelulares. Hay excepciones en cuanto a la presencia de más de una proteína 14-3-3, como es el caso de *C. albicans* (Cognetti et al, 2002) o el de los basidiomicetos *Ustilago maydis* (Mielnichuk & Pérez-Martín, 2008) y *Lentinus edodes* donde solamente se ha identificado una isoforma 14-3-3 (Zhou et al, 2000).

Dada la gran variedad de procesos en los que intervienen las proteínas 14-3-3, multitud de trabajos se han encaminado a identificar proteínas que interaccionen con ellas. Ya que dichas proteínas han de estar fosforiladas, una variedad de quinasas deben participar en la fosforilación de las mismas. Varios abordajes proteómicos han identificado toda una batería de quinasas y de proteínas fosforiladas que pudieran interaccionar con Bmh1/2 (van Heusden, 2009). Entre las quinasas identificadas, Tpk1, Ptk2 y las caseína quinasas Yck1 y Yck2 son las que fosforilan el mayor número de interactores.

Parte de estas proteínas intervienen en el ciclo celular. En este sentido, Bmh1 regula negativamente el ciclo celular en *U. maydis* y de forma similar en *S. pombe*, interaccionando físicamente con la fosfatasa Cdc25 (Mielnichuk & Pérez-Martín, 2008). Se ha identificado asimismo interactores pertenecientes a cascadas de señalización como RAS/MAPK en *S. cerevisiae* (Roberts et al, 1997).

En este trabajo se han identificado dos proteínas 14-3-3, Bmh1 y Bmh2 con funciones muy diferentes en *F. oxysporum*. De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que Bmh1 no tiene un papel importante en ninguno de los procesos analizados, si bien la presencia tanto a nivel de transcrito como de proteína indica un nivel de expresión significativo y superior al de Bmh2.

El crecimiento en medio sólido refleja el establecimiento del crecimiento polarizado y la fusión de las hifas en el desarrollo de un micelio bien conectado. Bmh2 participa de manera importante en el desarrollo de la colonia, presentando los mutantes un nivel de filamentación reducido y fundamentalmente penetrando hacia el interior del medio. Este crecimiento invasivo es reducido al añadir al medio un estabilizador osmótico que podría recuperar el turgor de las hifas (Liu, 2010). El crecimiento invasivo se vió más pronunciado en el mutante con la proteína Bmh2 truncada, lo que pone de manifiesto que la ausencia del extremo carboxilo produce un efecto más importante que la ausencia de la proteína completa. Dado que el posible dominio PEST se encuentra localizado en el extremo carboxilo de la proteína, se podría pensar que el mantenimiento no regulado de Bmh2 fuera responsable de la invasión incrementada en el medio.

La proteína quinasa Tor regula el crecimiento celular en los eucariotas en respuesta a nutrientes (De Virgilio & Loewith, 2006; Rohde et al, 2008). La rapamicina es inhibidor específico de Tor y por lo tanto inhibidor del crecimiento celular aun en presencia de nutrientes, lo que permite establecer una relación entre la sensibilidad a rapamicina y el correcto funcionamiento de la ruta Tor. Al igual que en *S. cerevisiae* (Beck & Hall, 1999; Bertram et al, 1998), Bmh2 participa en las vías de resistencia a rapamicina, presentando asimismo una reducción en el crecimiento en los distintos medios. Estos resultados están acorde con los obtenidos en levaduras donde el mutante  $\Delta bmh1$  presenta un proteoma enriquecido en proteínas implicadas en transporte y asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno (Bruckmann et al, 2007; Ichimura et al, 2004). En dicho análisis, la proteína PMG1 (fosfoglucosutasa), que parece ser necesaria para la asimilación de glucosa (Hofmann et al, 1994), se encuentra sub-expresada, lo que podría explicar el menor crecimiento en presencia de glucosa del mutante  $\Delta bmh1$  de *F. oxysporum*.

La resistencia a estrés térmico conlleva la actuación de moléculas chaperonas y la expresión de genes que codifican proteínas de choque térmico, como ocurre en *S.*

*cerevisiae* (Wang et al, 2009). La resistencia incrementada del mutante  $\Delta bmh2$  al crecimiento prolongado a 37°C sugiere que Bmh2 pueda modificar inactivando parcialmente a chaperonas necesarias para el desarrollo a altas temperaturas. Para esa actividad sería necesaria la proteína completa, ya que la presencia de la proteína truncada tiene el mismo efecto que su ausencia.

El crecimiento en presencia de compuestos que afectan a la pared celular y/o membrana plasmática nos permite decir que, a diferencia de sus ortólogos en levaduras (Lotterberger et al, 2006) Bmh1 ni Bmh2 están implicados en integridad celular.

La ruta de señalización MAPK Fmk1 (Di Pietro et al, 2001; Rispail & Di Pietro, 2009) es necesaria para el crecimiento invasivo y la infección de las plantas de tomate. La capacidad de penetrar membranas de celofán permite estudiar el crecimiento invasivo sobre una superficie sólida y como se ha demostrado define una importante función para la virulencia (Prados Rosales & Di Pietro, 2008; Rispail & Di Pietro, 2009). Se ha demostrado además que la capacidad de penetrar el celofán está inhibida por amonio pero no por nitrato (López-Berges et al, 2010). Aunque Bmh2 no es esencial para el crecimiento invasivo, si juega un papel importante a juzgar por el comportamiento del mutante con la proteína Bmh2 truncada, que a diferencia de la estirpe  $\Delta bmh2$  es capaz de traspasar el celofán e invadir el medio en presencia de amonio. Se sugiere que este hecho no se debe a la falta de la  $\alpha$ -hélice 9 sino a la falta del dominio PEST que determina su degradación por ubiquitinación lo que promueve la acumulación de Bmh2 y su acción en la invasión del agar.

Aunque se conoce poco del papel de estas proteínas en otros hongos patógenos, en la levadura *C. albicans*, mutantes *bmh1* están afectados en virulencia, por lo que se atribuye a Bmh1 un papel en la infección en humanos (Kelly et al, 2009) así como en *Paracoccidoides brasiliensis* (da Silva et al, 2013). Si bien Bmh2 es necesaria para el completo desarrollo de la enfermedad en *F. oxysporum*, la ausencia de Bmh1 no presentó ningún retraso en la enfermedad. Sorprendentemente, la ausencia de la  $\alpha$ -hélice 9 junto con la cola carboxiterminal (poco conservada en las proteínas 14-3-3) en el mutante con la proteína Bmh2 truncada, recuperó la evolución de la enfermedad al nivel del silvestre, lo que sugiere que la proteína es funcional para el proceso de infección. De lo expuesto anteriormente se deduce que la  $\alpha$ -hélice 9 no es necesaria para el proceso de infección.

Aunque Bmh1 y Bmh2 presentan sólo un 73% de similitud, los aminoácidos implicados en los dominios de dimerización y de unión a ligando están muy conservados. Las diferencias más importantes observadas se encuentran en las  $\alpha$ -hélices 4 y 6 siendo esos aminoácidos los menos conservados entre las diferentes proteínas 14-3-3 de hongos. No obstante, la serina 188 (S189) identificada en *S. cerevisiae* como necesaria para el control del ciclo celular (Grandin & Charbonneau, 2008) no está conservada en Bmh1. La complementación de la cepa *bmh2* con un alelo *bmh1A188S* recuperó el patrón de infección del silvestre, sugiriendo que dicho aminoácido es importante para el correcto funcionamiento de las proteínas 14-3-3 en el desarrollo de la enfermedad.

Aunque desconocemos la base molecular de la reducción en virulencia, los resultados obtenidos se podrían explicar, en parte, a un deficiente crecimiento en casi todas las fuentes de carbono y nitrógeno analizadas, ya que el mutante  $\Delta bmh2$  parece tener afectada la ruta de señalización TOR. Sin embargo, al tratarse de proteínas cuyos ortólogos están implicados en multitud de vías de señalización es muy probable que Bmh2 de *F. oxysporum* conserve algunas de esas funciones que aún están por dilucidar y que podrían explicar mejor el fenotipo de infección.



**Conclusiones**





1. El sistema de degradación de proteínas dependiente de ubiquitina participa, aunque no es esencial, en el desarrollo de la enfermedad de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate.
2. Fbp1 regula las funciones de virulencia a través de la cascada de señalización MAPK *Fmk1*.
3. En *Fusarium oxysporum*, la ruta de señalización MAPK *Mpk1* está controlada por Fbp1.
4. Bmh2 regula el crecimiento y la virulencia de *Fusarium oxysporum*.
5. El dominio carboxilo-terminal de la proteína Bmh2 regula la represión del crecimiento invasivo en presencia de amonio.
6. Bmh2 protege frente a estreses que inducen muerte celular como la rapamicina, sugiriendo un papel antiapoptótico.



## **Bibliografía**



- Agrios GN (1997) Plant Pathology. *San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc*
- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111-118
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Andrews RK, Harris SJ, McNally T, Berndt MC (1998) Binding of purified 14-3-3  $\delta$  signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry* **37**: 638-647
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology* **55**: 539-552
- Arino J, Casamayor A, Gonzalez A (2011) Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot Cell* **10**: 21-33
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201
- Atir-Lande A, Gildor T, Kornitzer D (2005) Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Molecular biology of the cell* **16**: 2772-2785
- Atkinson HA, Daniels A, Read ND (2002) Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 233-244
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroek EnJ, Waalwijk C (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90**: 891-900
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 505-510
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263-274
- Bao MZ, Schwartz MA, Cantin GT, Yates III JR, Madhani HD (2004) Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**: 991-1000
- Bastians H, Topper LM, Gorbsky GL, Ruderman JV (1999) Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Molecular biology of the cell* **10**: 3927-3941
- Beck T, Hall MN (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692

- Beckman CH (1987) *The nature of wilt diseases of plants*: APS press.
- Bednarek P, Osbourn A (2009) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**: 746-748
- Benanti JA, Cheung SK, Brady MC, Toczyski DP (2007) A proteomic screen reveals SCFGrr1 targets that regulate the glycolytic–gluconeogenic switch. *Nature cell biology* **9**: 1184-1191
- Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer cell* **14**: 10-21
- Bertram PG, Zeng C, Thorson J, Shaw AS, Zheng X (1998) The 14-3-3 proteins positively regulate rapamycin-sensitive signaling. *Current biology* **8**: 1259-S1251
- Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez JC, Hochstrasser D (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* **14**: 1357-1365
- Bölker M (1998) Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **25**: 143-156
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. *The genus Fusarium*
- Borgia PT, Miao Y, Dodge CL (1996) The *orlA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Mol Microbiol* **20**: 1287-1296
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889-892
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brand A, Gow NA (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Current opinion in microbiology* **12**: 350-357
- Braselmann S, McCormick F (1995) Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *The EMBO journal* **14**: 4839
- Bravo-Ruiz G, Ruiz-Roldan C, Roncero M (2013) Lipolytic system of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*
- Bruckmann A, Hensbergen PJ, Balog CI, Deelder AM, Steensma HY, van Heusden GPH (2007) Post-Transcriptional Control of the *S accharomyces cerevisiae* Proteome by 14-3-3 Proteins. *Journal of proteome research* **6**: 1689-1699
- Burnett J (1984) Aspects of *Fusarium* genetics. *The applied mycology of fusarium Cambridge University Press, New York*: 39-69

Butler DK, All O, Goffena J, Loveless T, Wilson T, Toenjes KA (2006) The GRR1 gene of *Candida albicans* is involved in the negative control of pseudohyphal morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 573-582

Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**: 671-682

Callow JA (1987) Models for host-patogen interactions. *The applied mycology of Fusarium Ed, Cambridge University Press*: 39-69

Camoni L, Visconti S, Marra M, Aducci P (2001) Adenosine 5,  $\ddot{A}$  -monophosphate inhibits the association of 14-3-3 proteins with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 31709-31712

Cañero DC, Roncero MIG (2008) Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* **154**: 1474-1481

Caracuel Z, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Madrid MP, Roncero MIG (2005) *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative  $\beta$ -1, 3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions* **18**: 1140-1147

Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 739-751

Carroll AM, Sweigard JA, Valent B (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Newsletter* **41**

Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552

Catlett NL, Lee BN, Poder OC, Turgeon G (2003) Split-Marker Recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter* **50**: 3

Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 79-87

Ciechanover A, Iwai K (2004) The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB life* **56**: 193-201

Cognetti D, Davis D, Sturtevant J (2002) The *Candida albicans* 14-3-3 gene, BMH1, is essential for growth. *Yeast* **19**: 55-67

Connelly C, Hieter P (1996) Budding Yeast SKP1 Encodes an Evolutionarily Conserved Kinetochores Protein Required for Cell Cycle Progression. *Cell* **86**: 275-285

Cosson P, Demolliere C, Hennecke S, Duden R, Letourneur F (1996) Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J* **15**: 1792-1798



Cove DJ (1976) Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity (Edinb)* **36**: 191-203

Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park S-Y, Kang S (2007) In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1011-1023

Chen RE, Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1773**: 1311-1340

Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 98-106

Chevenet F, Brun C, Bañuls A-L, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics* **7**: 439

Chou S, Huang L, Liu H (2004) Fus3-Regulated Tec1 Degradation through SCFCdc4 Determines MAPK Signaling Specificity during Mating in Yeast. *Cell* **119**: 981-990

Chou S, Lane S, Liu H (2006) Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **26**: 4794-4805

Chou S, Zhao S, Song Y, Liu H, Nie Q (2008) Fus3-triggered Tec1 degradation modulates mating transcriptional output during the pheromone response. *Molecular systems biology* **4**

D'Angiolella V, Esencay M, Pagano M (2013) A cyclin without cyclin-dependent kinases: cyclin F controls genome stability through ubiquitin-mediated proteolysis. *Trends in cell biology* **23**: 135-140

da Silva JdF, de Oliveira HC, Marcos CM, da Silva RAM, da Costa TA, Calich VLG, Almeida AMF, Mendes-Giannini MJS (2013) Paracoccidoides brasiliensis 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. *PLoS one* **8**: e62533

Daboussi M-Je, Capy P (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Reviews in Microbiology* **57**: 275-299

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular cell* **6**: 41-51

de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG (1998) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology* **16**

De Virgilio C, Loewith R (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**: 6392-6415

Decker BL, Wickner WT (2006) Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J Biol Chem* **281**: 14523-14528

Delgado-Jarana J, Martinez-Rocha AL, Roldan-Rodriguez R, Roncero MI, 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

Dereeper A, Audic S, Claverie J-M, Blanc G (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology* **10**: 8

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M (2008) Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research* **36**: W465-W469

Desjardins AE, Hohn TM, McCORMICK SP (1993) Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological reviews* **57**: 595-604

Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Meglecz E, Roncero MI (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**: 1140-1152

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

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

Di Pietro A, Roncero MIG, Roldán MCR (2009) From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection. In *Plant Relationships*, pp 181-200. Springer

Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobítz M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J-F, Notredame C (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research* **39**: W13-W17

Divon HH, Ziv C, Davydov O, Yarden O, Fluhr R (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during Fusarium oxysporum pathogenesis. *Molecular plant pathology* **7**: 485-497

Dixon RA, Lamb CJ (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual review of plant biology* **41**: 339-367

Dou X, Wang Q, Qi Z, Song W, Wang W, Guo M, Zhang H, Zhang Z, Wang P, Zheng X (2011) MoVam7, a conserved SNARE involved in vacuole assembly, is required for growth, endocytosis, ROS accumulation, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *PloS one* **6**: e16439

Du X, Fox JE, Pei S (1996) Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 7362-7367

Duyvesteijn RG, van Wijk R, Boer Y, Rep M, Cornelissen BJ, Haring MA (2005) Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Mol Microbiol* **57**: 1051-1063

Eckert-Boulet N, Regenberg B, Nielsen J (2005) Grr1p is required for transcriptional induction of amino acid permease genes and proper transcriptional regulation of genes in carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **47**: 139-149

Esch R, Errede B (2002) Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 9160-9165

Farman ML, Eto Y, Nakao T, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S, Leong SA (2002) Analysis of the structure of the AVR1-CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 6-16

Feldman R, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**: 221-230

Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**: 246-259

Flick J, Johnston M (1991) GRR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Molecular and cellular biology* **11**: 5101-5112

Flor H (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: 653-669

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

Ford JC, Al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths D, Carr AM (1994) 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science* **265**: 533-535

Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36774-36780

Galan JM, Haguenaer-Tsapis R (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *The EMBO journal* **16**: 5847-5854

Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 15183-15195

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Science Signaling* **11**: 4241

Gelperin D, Horton L, DeChant A, Hensold J, Lemmon SK (2002) Loss of ypk1 function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. *Genetics* **161**: 1453-1464

Gelperin D, Weigle J, Nelson K, Roseboom P, Irie K, Matsumoto K, Lemmon S (1995) 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 11539-11543

Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* **82**: 373-428

Gonzalez A, Caro E, Munoz C, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE (2008) *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. *Microb Pathog* **44**: 389-401

Grandin N, Charbonneau M (2008) Budding yeast 14-3-3 proteins contribute to the robustness of the DNA damage and spindle checkpoints. *Cell cycle* **7**: 2749-2761

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998) MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews* **62**: 1264-1300

Haas A, Wickner W (1996) Homotypic vacuole fusion requires Sec17p (yeast alpha-SNAP) and Sec18p (yeast NSF). *EMBO J* **15**: 3296-3305

Hamel L-P, Nicole M-C, Duplessis Sb, Ellis BE (2012) Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: Distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell Online* **24**: 1327-1351

Hammond-Kosack KE, Jones J (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**: 1773

Han YK, Kim MD, Lee SH, Yun SH, Lee YW (2007) A novel F-box protein involved in sexual development and pathogenesis in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol* **63**: 768-779

Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *Oxford (G B), Ed D M Glover*

Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M (2005) Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225-229

Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry* **61**: 761-807

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system *Annual review of biochemistry* **67**: 425-479

Heusden GPH, Griffiths DJ, Ford JC, Schrader PA, Carr AM, Steensma HY (1995) The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Can be Replaced by a Plant Homologue. *European Journal of Biochemistry* **229**: 45-53

Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 195-201

Hicke L, Riezman H (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**: 277-287

Hofmann M, Boles E, Zimmermann FK (1994) Characterization of the essential yeast gene encoding N-acetylglucosamine-phosphate mutase. *European Journal of Biochemistry* **221**: 741-747

Honda R, Ohba Y, Yasuda H (1997) 14-3-3  $\zeta$  protein binds to the carboxyl half of mouse wee1 kinase. *Biochemical and biophysical research communications* **230**: 262-265

Houterman PM, Cornelissen BJ, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* **4**: e1000061

Huertas-Gonzalez M, Ruiz-Roldan M, Di Pietro A, Roncero M (1999) Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiological and molecular plant pathology* **54**: 63-72

Hurtado CA, Rachubinski RA (2002) Y1BMH1 encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **148**: 3725-3735

Ichimura T, Ito M, Itagaki C, Takahashi M, Horigome T, Omata S, Ohno S, Isobe T (1997) The 14-3-3 protein binds its target proteins with a common site located towards the C-terminus. *FEBS letters* **413**: 273-276

Ichimura T, Kubota H, Goma T, Mizushima N, Ohsumi Y, Iwago M, Kakiuchi K, Shekhar HU, Shinkawa T, Taoka M (2004) Transcriptomic and proteomic analysis of a 14-3-3 gene-deficient yeast. *Biochemistry* **43**: 6149-6158

Ichimura T, Uchiyama J, Kunihiro O, Ito M, Horigome T, Omata S, Shinkai F, Kaji H, Isobe T (1995) Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 28515-28518

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

Isaacson RE (2002) Genomics and the prospects for the discovery of new targets for antibacterial and antifungal agents. *Current pharmaceutical design* **8**: 1091-1098

Jackson AO, Taylor CB (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *The Plant Cell* **8**: 1651

Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in cell biology* **10**: 429-439

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

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

Jiang J, Yun Y, Yang Q, Shim W-B, Wang Z, Ma Z (2011) A type 2C protein phosphatase FgPtc3 is involved in cell wall integrity, lipid metabolism, and virulence in *Fusarium graminearum*. *PloS one* **6**: e25311

Jiang L, Yang J, Fan F, Zhang D, Wang X (2010) The Type 2C protein phosphatase FgPtc1p of the plant fungal pathogen *Fusarium graminearum* is involved in lithium toxicity and virulence. *Molecular plant pathology* **11**: 277-282

Jones DH, Ley S, Aitken A (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS letters* **368**: 55-58

Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology* **292**: 195-202

Jonkers W, Rep M (2009) Lessons from fungal F-box proteins. *Eukaryotic cell* **8**: 677-695

Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI (2000) Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF<sup>Met30</sup>-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**: 303-314

Kamura T, Koepp D, Conrad M, Skowyra D, Moreland R, Iliopoulos O, Lane W, Kaelin W, Elledge S, Conaway R (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**: 657-661

Kelly MN, Johnston DA, Peel BA, Morgan TW, Palmer GE, Sturtevant JE (2009) Bmh1p (14-3-3) mediates pathways associated with virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* **155**: 1536-1546

Kipreos ET, Pagano M (2000) The F-box protein family. *Genome Biol* **1**: R3002

Knogge W (1996) Fungal infection of plants. *The Plant Cell* **8**: 1711

Kölling R, Hollenberg CP (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *The EMBO journal* **13**: 3261

Krisak L, Strich R, Winters RS, Hall JP, Mallory MJ, Kreitzer D, Tuan RS, Winter E (1994) SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **8**: 2151-2161

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology* **48**: 251-275

Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**: 1807-1819

Lee Y-H, Dean RA (1993) cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **5**: 693-700

Lesage G, Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews* **70**: 317-343

Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews* **69**: 262-291

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

Li N, Wang H, Fan J, Tong C, Yang J, Wei H, Yi J, Ling R (2013) Overexpression of 14-3-30 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in breast carcinoma. *Oncotarget*

Li WJ, Wang YM, Zheng XD, Shi QM, Zhang TT, Bai C, Li D, Sang JL, Wang Y (2006) The F-box protein Grr1 regulates the stability of Ccn1, Cln3 and Hof1 and cell morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **62**: 212-226

Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**: 5

Liu T-B, Wang Y, Stukes S, Chen Q, Casadevall A, Xue C (2011) The F-Box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell* **10**: 791-802

Liu T-B, Xue C (2011) The ubiquitin-proteasome system and F-box proteins in pathogenic fungi. *Mycobiology* **39**: 243-248

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408

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, Capilla J, Turrà D, Schafferer L, Matthijs S, Jöchl 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*. *The Plant Cell Online* **24**: 3805-3822

López-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell Online* **22**: 2459-2475

López-Fernández L, Ruiz-Roldán C, Pareja-Jaime Y, Prieto A, Khraiweh H, Roncero MIG (2013) The *Fusarium oxysporum* gnt2, Encoding a Putative N-Acetylglucosamine Transferase, Is Involved in Cell Wall Architecture and Virulence. *PLoS ONE* **8**: e84690

Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**: 172-175

López-Berges MS, Di Pietro A, Daboussi MJ, Wahab HA, Vasnier C, Roncero MIG, Dufresne M, Hera C (2009) Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Molecular plant pathology* **10**: 95-107

Lottersberger F, Panza A, Lucchini G, Piatti S, Longhese MP (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. *Genetics* **173**: 661-675

Lu G, Sehnke PC, Ferl RJ (1994) Phosphorylation and calcium binding properties of an *Arabidopsis* GF14 brain protein homolog. *The Plant Cell Online* **6**: 501-510

Luo Z-j, Zhang X-f, Rapp U, Avruch J (1995) Identification of the 14.3.3 domains important for self-association and Raf binding. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 23681-23687

Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim WB, Woloshuk C, Xie X, Xu JR, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A, Brown DW, Butchko RA, Chapman S, Coulson R, Coutinho PM, Danchin EG, Diener A, Gale LR, Gardiner



DM, Goff S, Hammond-Kosack KE, Hilburn K, Hua-Van A, Jonkers W, Kazan K, Kodira CD, Koehrsen M, Kumar L, Lee YH, Li L, Manners JM, Miranda-Saavedra D, Mukherjee M, Park G, Park J, Park SY, Proctor RH, Regev A, Ruiz-Roldan MC, Sain D, Sakthikumar S, Sykes S, Schwartz DC, Turgeon BG, Wapinski I, Yoder O, Young S, Zeng Q, Zhou S, Galagan J, Cuomo CA, Kistler HC, Rep M (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367-373

Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MIG (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular microbiology* **47**: 257-266

Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C, Brygoo Y (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**: 147-156

Martín-Urdíroz M, Roncero MIG, González-Reyes JA, Ruiz-Roldán C (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 112-121

Martínez-Rocha AL, Roncero MIG, López-Ramírez A, Mariné M, Guarro J, Martínez-Cadena G, Di Pietro A (2008) Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cellular microbiology* **10**: 1339-1351

Mattern I, Punt P, Van den Hondel C (1988) A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Genet Newsl* **35**: 25

Matthews DE, Van Etten HD (1983) Detoxification of the phytoalexin pisatin by a fungal cytochrome *P*-450. *Archives of biochemistry and biophysics* **224**: 494-505

McCourt P, Gallo-Ebert C, Gonghong Y, Jiang Y, Nickels JT, Jr. (2013) PP2A(Cdc55) regulates G1 cyclin stability. *Cell Cycle* **12**: 1201-1210

Mes JJ, Weststeijn EA, Herlaar F, Lambalk JJ, Wijbrandi J, Haring MA, Cornelissen BJ (1999) Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* **89**: 156-160

Michael WM, Newport J (1998) Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* **282**: 1886-1889

Michielse CB, Reijnen L, Olivain C, Alabouvette C, Rep M (2012) Degradation of aromatic compounds through the beta-ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mol Plant Pathol* **13**: 1089-1100

Michielse CB, Rep M (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* **10**: 311-324

Mielnichuk N, Pérez-Martín J (2008) 14-3-3 regulates the G2/M transition in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1206-1215

Miguel-Rojas C, Hera C (2013) Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCF-mediated proteolysis pathway in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* **14**: 12

Mitchell TK, Dean RA (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **7**: 1869-1878

Mitsiades C, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson P, Anderson K (2005) Proteasome inhibitors as therapeutics. *Essays Biochem* **41**: 205-218

Mockaitis K, Estelle M (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual review of cell and developmental biology* **24**: 55-80

Molina M, Cid VJ, Martin H (2010) Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast* **27**: 503-511

Moore BW, Perez VJ (1967) Specific proteins of the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration, Carlson FD (ed) Prentice Hall Inc: The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA*: 343-359

Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel CV, Notredame C (2007) The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic acids research* **35**: W645-W648

Morrissey JP, Osbourn AE (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 708-724

Moss MO, Smith JE (2011) The applied mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, September 1982. In *The applied mycology of Fusarium: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, September 1982*.

Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**: 201-205

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897

Muslin AJ, Xing H (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular signalling* **12**: 703-709

Namiki F, Matsunaga M, Okuda M, Inoue I, Nishi K, Fujita Y, Tsuge T (2001) Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 580-584

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* **302**: 205-217

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 2044-2049

Obšilová V, ŠILHAN J, BOUŘA E, Teisinger J, OBŠIL T (2008) 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* **57**: S11-S21

Olivain C, Alabouvette C (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-*pathogenic* strain. *New Phytologist* **141**: 497-510

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

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

Osborn AE (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* **8**: 1821

Ospina-Giraldo MD, Mullins E, Kang S (2003) Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Current genetics* **44**: 49-57

Palmer GE, Johnson KJ, Ghosh S, Sturtevant J (2004) Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. *Microbiology* **150**: 1911-1924

Pareja-Jaime Y, Roncero MIG, Ruiz-Roldán MC (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 728-736

Pareja Jaime Y, Martín Urdiroz M, Roncero MIG, Gonzalez Reyes JA, Roldan MdCR (2010) Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Molecular plant pathology* **11**: 479-493

Pascon RC, Ganous TM, Kingsbury JM, Cox GM, McCusker JH (2004) *Cryptococcus neoformans* methionine synthase: expression analysis and requirement for virulence. *Microbiology* **150**: 3013-3023

Patton EE, Willems AR, Tyers M (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends in genetics* **14**: 236-243

Peisker K, Chiabudini M, Rospert S (2010) The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 662-672

Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature biotechnology* **21**: 921-926

Peñalva MA (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963-975

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

Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. *Cell* **123**: 1107-1120

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45

Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* **70**: 503-533

Pitarch A, Pardo M, Jimenez A, Pla J, Gil C, Sanchez M, Nombela C (1999) Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* **20**: 1001-1010

Powell DW, Rane MJ, Joughin BA, Kalmukova R, Hong J-H, Tidor B, Dean WL, Pierce WM, Klein JB, Yaffe MB (2003) Proteomic identification of 14-3-3  $\delta$  as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding. *Molecular and cellular biology* **23**: 5376-5387

Powell WA, Kistler HC (1990) In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *Journal of bacteriology* **172**: 3163-3171

Prados Rosales RC, Di Pietro A (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **7**: 162-171

Prusky D, Keen NT (1993) Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dis* **77**: 114-119

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

Puhalla JE (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* **63**: 179-183

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

- Qi M, Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**: 3569-3572
- Qureshi HY, Li T, MacDonald R, Cho CM, Leclerc N, Paudel HK (2013) Interaction of 14-3-3 $\zeta$  with Microtubule-Associated Protein Tau within Alzheimer's Disease Neurofibrillary Tangles. *Biochemistry* **52**: 6445-6455
- Read ND, Kalkman ER (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology* **39**: 199-203
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences* **21**: 267-271
- Rep M, Meijer M, Houterman P, Van Der Does H, Cornelissen B (2005) *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular plant-microbe interactions* **18**: 15-23
- Rep M, Van Der Does HC, Meijer M, Van Wijk R, Houterman PM, Dekker HL, De Koster CG, Cornelissen BJ (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular microbiology* **53**: 1373-1383
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**: 1543-1552
- Rispail N, Di Pietro A (2009) *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 830-839
- Rispail N, Di Pietro A (2010) The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* **11**: 395-407
- Rispail N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Gnler A, Huguet R, Perez -Nadales E, Poli A, Sartorel E, Valiante V (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calcium,  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 287-298
- Rittinger K, Budman J, Xu J, Volinia S, Cantley LC, Smerdon SJ, Gamblin SJ, Yaffe MB (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular cell* **4**: 153-166
- Roberts RL, Möscher H-U, Fink GR (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**: 1055-1065
- Roddick JG (1977) Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **16**: 805-807
- Rodriguez-Galvez E, Mendgen K (1995) The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* **189**: 61-72

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368

Rohde JR, Bastidas R, Puria R, Cardenas ME (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in microbiology* **11**: 153-160

Roldán-Arjona T, Pérez-Espinosa A, Ruiz-Rubio M (1999) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular plant-microbe interactions* **12**: 852-861

Roth AF, Sullivan DM, Davis NG (1998) A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *The Journal of cell biology* **142**: 949-961

Ruiz-Roldan MC, Garre V, Guarro J, Marine M, Roncero MI (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **7**: 1227-1230

Sakamoto KM (2002) Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies. *Molecular genetics and metabolism* **77**: 44-56

Sambrook J, Russell DW, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set).

Shaw BD, Chung D-W, Wang C-L, Quintanilla LA, Upadhyay S (2011) A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal biology* **115**: 541-546

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**: 850-858

Shieh J-C, White A, Cheng Y-C, Rosamond J (2005) Identification and functional characterization of *Candida albicans* CDC4. *Journal of biomedical science* **12**: 913-924

Silva F, Navarro E, Peñaranda A, Murcia-Flores L, Torres-Martínez S, Garre V (2008) A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Molecular microbiology* **70**: 1026-1036

Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209-219

Sollner S, Macheroux P (2009) New roles of flavoproteins in molecular cell biology: an unexpected role for quinone reductases as regulators of proteasomal degradation. *FEBS J* **276**: 4313-4324

Spang A (2002) ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 423-427

Spielewoy N, Flick K, Kalashnikova TI, Walker JR, Wittenberg C (2004) Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Molecular and cellular biology* **24**: 8994-9005

Spielewoy N, Guaderrama M, Wohlschlegel JA, Ashe M, Yates JR, Wittenberg C (2010) Npr2, yeast homolog of the human tumor suppressor NPRL2, is a target of Grr1 required for adaptation to growth on diverse nitrogen sources. *Eukaryotic cell* **9**: 592-601

Spruck CH, Strohmaier HM (2002) Seek and Destroy: SCF ubiquitin ligases in mammalian cell cycle control. *Cell Cycle* **1**: 250-254

Sweigard JA, Carroll AM, Farrall L, Chumley FG, Valent B (1998) Magnaporthe grisea pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 404-412

Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Molecular cell* **1**: 193-202

Teunissen H, Verkooijen J, Cornelissen B, Haring M (2002) Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics* **268**: 298-310

Tinti M, Madeira F, Murugesan G, Hoxhaj G, Toth R, MacKintosh C (2014) ANIA: ANnotation and Integrated Analysis of the 14-3-3 interactome. *Database: the journal of biological databases and curation* **2014**

Torres AM, Weeden NF, Martín A (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor Appl Genet* **85**: 9

Torres L, Martin H, Garcia-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sanchez M, Nombela C (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lyt2 mutants. *Mol Microbiol* **5**: 2845-2854

Tzivion G, Avruch J (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 3061-3064

Tzivion G, Luo Z-J, Avruch J (2000) Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 29772-29778

Tzivion G, Luo Z, Avruch J (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**: 88-92

Tzivion G, Shen YH, Zhu J (2001) 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* **20**

van Heusden G (2005) 14-3-3 Proteins: Regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB life* **57**: 623-629

- van Heusden GPH (2009) 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **94**: 287-293
- van Heusden GPH, Steensma HY (2001) 14-3-3 Proteins are essential for regulation of RTG3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1479-1491
- van Heusden GPH, Steensma HY (2006) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* **23**: 159-171
- van Heusden GPH, Wenzel TJ, Lagendijk EL, De Steensma H, van den Berg JA (1992) Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS letters* **302**: 145-150
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clinical infectious diseases* **17**: S487-S491
- Venancio TM, Balaji S, Iyer LM, Aravind L (2009) Reconstructing the ubiquitin network: cross-talk with other systems and identification of novel functions. *Genome Biol* **10**: R33
- Wallace IM, O'Sullivan O, Higgins DG, Notredame C (2006) M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic acids research* **34**: 1692-1699
- Wang C, Skinner C, Easlon E, Lin S-J (2009) Deleting the 14-3-3 protein Bmh1 extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing stress response. *Genetics* **183**: 1373-1384
- Wang H, Zhang L, Liddington R, Fu H (1998) Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3  $\delta$  disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 16297-16304
- Wang P, Shen G (2011) The endocytic adaptor proteins of pathogenic fungi: charting new and familiar pathways. *Medical Mycology* **49**: 449-457
- Wang Y, Liu TB, Patel S, Jiang L, Xue C (2011) The casein kinase I protein Cck1 regulates multiple signaling pathways and is essential for cell integrity and fungal virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **10**: 1455-1464
- Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D, Ota I (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **21**: 51-60
- Waterman M, Stavridi E, Waterman J, Halazonetis T (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**: 175-178
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 169-178
- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143



Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* **79**: 143-180

Wiebe M (2002) Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology* **58**: 421-427

Woodcock JM, Murphy J, Stomski FC, Berndt MC, Lopez AF (2003) The dimeric versus monomeric status of 14-3-3  $\delta$  is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 36323-36327

Würtele M, Jelich-Ottmann C, Wittinghofer A, Oecking C (2003) Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *The EMBO journal* **22**: 987-994

Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, Gamblin SJ (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**: 188-191

Xu J-R, Hamer JE (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & development* **10**: 2696-2706

Xu J-R, Staiger CJ, Hamer JE (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 12713-12718

Yaffe MB (2002) How do 14-3-3 proteins work?—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *Febs Letters* **513**: 53-57

Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**: 961-971

Yang J, Winkler K, Yoshida M, Kornbluth S (1999) Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *The EMBO journal* **18**: 2174-2183

Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, De Souza CP, Dou X, Perez-Balaguer A, Osmani SA (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359-1362

Yang X, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, Sundström M, Doyle DA, Elkins JM (2006) Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 17237-17242

Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 973-981

Yuan H, Michelsen K, Schwappach B (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* **13**: 638-646

Zhang L, Wang H, Liu D, Liddington R, Fu H (1997) Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3  $\delta$  through a common site involving lysine 49. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13717-13724

Zhao X, Mehrabi R, Xu J-R (2007) Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic cell* **6**: 1701-1714

Zhou G-L, Yamamoto T, Ozoe F, Yano D, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M (2000) Identification of a 14-3-3 protein from *Lentinus edodes* that interacts with CAP (adenylyl cyclase-associated protein), and conservation of this interaction in fission yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **64**: 149-159

Ziv I, Matiuhin Y, Kirkpatrick DS, Erpapazoglou Z, Leon S, Pantazopoulou M, Kim W, Gygi SP, Haguenauer-Tsapis R, Reis N (2011) A perturbed ubiquitin landscape distinguishes between ubiquitin in trafficking and in proteolysis. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**



**Publicaciones**

# Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCF<sup>Fbp1</sup>-mediated proteolysis pathway in *Fusarium oxysporum*

CRISTINA MIGUEL-ROJAS<sup>1,2</sup> AND CONCEPCION HERA<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

<sup>2</sup>Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, 14071 Córdoba, Spain

## SUMMARY

F-box proteins function in the recruitment of proteins for SCF ubiquitination and proteasome degradation. Here, we studied the role of Fbp1, a nonessential F-box protein of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The  $\Delta fbp1$  mutant showed a significant delay in the production of wilt symptoms on tomato plants and was impaired in invasive growth on cellophane membranes and on living plant tissue. To search for target proteins recruited by Fbp1, a combination of sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) was used to compare proteins in mycelia of the wild-type and  $\Delta fbp1$  mutant. The proteomic approach identified 41 proteins differing significantly in abundance between the two strains, 17 of which were more abundant in the  $\Delta fbp1$  mutant, suggesting a possible regulation by proteasome degradation. Interestingly, several of the identified proteins were related to vesicle trafficking. Microscopic analysis revealed an impairment of the  $\Delta fbp1$  strain in directional growth and in the structure of the Spitzenkörper, suggesting a role of Fbp1 in hyphal orientation. Our results indicate that Fbp1 regulates protein turnover and pathogenicity in *F. oxysporum*.

## INTRODUCTION

*Fusarium oxysporum* is a ubiquitous soil-borne ascomycete, which causes vascular wilt disease on more than 100 plant species, provoking severe losses in important crops, such as banana, cotton, melon and tomato (Gordon and Martyn, 1997). This fungus is also being recognized as an emerging human pathogen which poses a lethal threat to immune compromised individuals (Nucci and Anaissie, 2007). Its remarkably broad host range and the array of molecular tools available make *F. oxysporum* an attractive model for the study of the different aspects of fungal infection (Di Pietro *et al.*, 2003; Michiels and Rep, 2009).

In recent years, several genes governing the pathogenicity of *Fusarium* have been identified, including those involved in signal

transduction (Di Pietro *et al.*, 2001), nutrient signalling (Lopez-Berges *et al.*, 2010) and cell wall biosynthesis (Madrid *et al.*, 2003), among others. Moreover, F-box proteins, such as Frp1 (Duyvesteijn *et al.*, 2005) and Fbp1 (Han *et al.*, 2007), have been shown to function in the pathogenicity of *F. oxysporum* and *F. graminearum*, respectively. F-box proteins play a key role in protein turnover, an important regulatory mechanism of cellular function in eukaryotic cells. In addition to proteolytic degradation, other biological pathways that are regulated by ubiquitination include endocytosis and intracellular trafficking (Madhus, 2006; Mosesson and Yarden, 2006; Saksena *et al.*, 2007), histone and transcriptional regulation (Kodadek, 2010), autophagy (Kirkin *et al.*, 2009), DNA repair (Thomson and Guerra-Rebollo, 2010) and diverse cellular signalling (Chen and Sun, 2009; Haglund and Dikic, 2005; Kawadler and Yang, 2006).

Fungal F-box proteins have been reported to regulate distinct cellular functions (Jonkers and Rep, 2009). The GRR1 F-box protein of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the SCF<sup>GRR1</sup> E3 ligase which interacts with Skp1 via its F-box domain and with downstream targets via its leucine-rich repeat (LRR) domain. GRR1 was originally identified as a primary element responsive for glucose repression (Flick and Johnston, 1991), and was also found to control amino acid sensing (Bernard and Andre, 2001) and cell cycle regulation (Blondel *et al.*, 2000). In addition to *S. cerevisiae*, the role of F-box proteins in fungal development has been reported in other ascomycetes, such as Grr1 and Cdc4 in *Candida albicans* (Atir-Lande *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006), GrrA in *Aspergillus nidulans* (Krappmann *et al.*, 2006), Fwd1 and Scorn2 in *Neurospora crassa* (He *et al.*, 2003; He and Liu, 2005; Kumar and Paietta, 1998), Pth1 in *Magnaporthe grisea* (Sweigard *et al.*, 1998), Fbp1 in *F. graminearum* (Han *et al.*, 2007) and Frp1 in *F. oxysporum* (Duyvesteijn *et al.*, 2005). Recently, a role of Fbp1 has been reported in the sexual reproduction and virulence of the basidiomycetous yeast pathogen *Cryptococcus neoformans* (Liu *et al.*, 2011). Interestingly, all F-box proteins tested so far in plant fungal pathogens (Pth1, Fbp1 and Frp1) are required for fungal pathogenicity. However, despite their importance in the regulation of fungal development and virulence, the role of F-box proteins in pathogenicity remains poorly understood.

In this study, we analysed the role of Fbp1 in the pathogenicity of *F. oxysporum* by construction of a  $\Delta fbp1$  null mutant. We found that Fbp1 is essential for invasive growth and tomato plant

\*Correspondence: Email: ge1hedic@uco.es

infection. We carried out a proteomic approach to identify the target proteins of Fbp1 with a possible role in the pathogenicity process. In addition to proteins involved in metabolism and oxidation–reduction processes, some candidate proteins related to adhesion, cell signalling and vesicle trafficking were identified. This is the first proteomic approach revealing the candidate targets of Fbp1-mediated proteolysis in fungal plant pathogens.

## RESULTS

### The *fbp1* gene encodes an F-box protein conserved among fungi that is important for invasive growth and pathogenicity of *F. oxysporum*

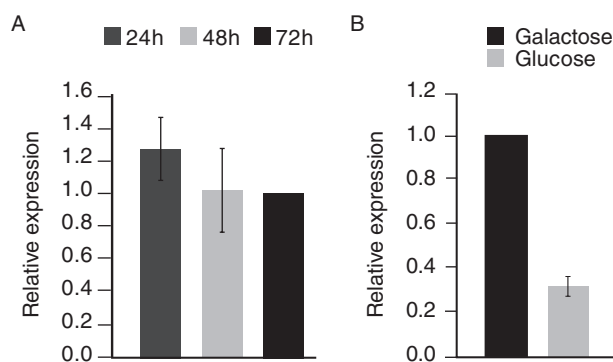
The genome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* contains 53 predicted F-box proteins, as revealed by a search of the genome database. *FOXG\_04438* encodes the orthologue of the *F. graminearum* *fbp1* gene (Han *et al.*, 2007). The deduced protein is 743 amino acids in length with the genomic sequence interrupted by three putative introns. Like yeast GRR1 and the orthologues in other fungi, Fbp1 contains a putative F-box domain and 12 tandem copies of a 26-amino-acid sequence, the LRR domain (Fig. S1, see Supporting Information). The predicted protein sequence of Fbp1 presents high similarity (87% amino acid identity) to *F. graminearum* Fbp1. The identity level increases to nearly 99% when the conserved F-box and LRR domains are compared.

We analysed *fbp1* gene expression during different growth conditions using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). *fbp1* was constitutively expressed in the wild-type strain grown in potato dextrose broth (PDB) liquid medium (Fig. 1A). This result is consistent with those reported in *F. graminearum* (Han *et al.*, 2007). We also tested the effect of the carbon source on the expression of the *fbp1* gene. Our qRT-PCR results showed a lower expression level in glucose than in galactose (Fig. 1B).

The biological role of Fbp1 in *F. oxysporum* was explored by the generation of a  $\Delta fbp1$  deletion allele by replacing the *fbp1* open reading frame (ORF) with the hygromycin resistance cassette (Fig. S2A, see Supporting Information). PCR and Southern blot analysis (Fig. S2B,C) established that two independent mutants, named  $\Delta fbp1\#1$  and  $\Delta fbp1\#3$ , lacked a functional copy of the *fbp1* gene.

To confirm that the phenotype of the  $\Delta fbp1$  mutant was indeed caused by a loss of *fbp1* function, a 5-kb fragment encompassing the complete *F. oxysporum* *fbp1* gene was introduced into the  $\Delta fbp1$  strain by co-transformation with the phleomycin resistance marker. Three phleomycin resistance transformants were analysed by PCR with gene-specific primers and found to have integrated an intact copy of the *fbp1* gene into the genome (Fig. S2D).

Invasive growth, a virulence-related process with analogies to agar invasion in yeast, was analysed using the cellophane



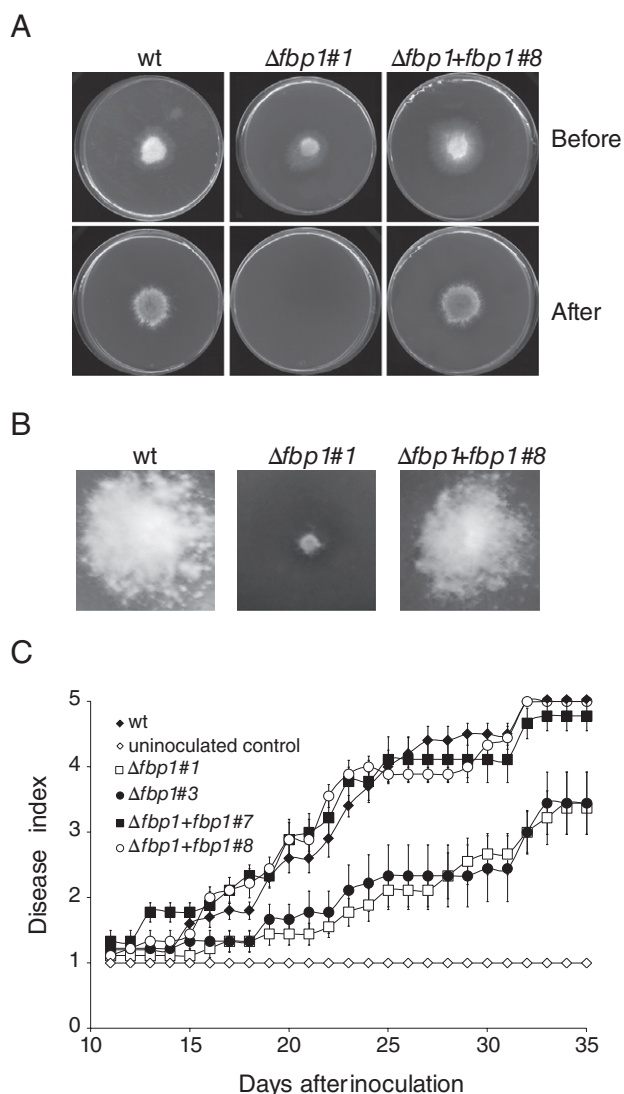
**Fig. 1** Expression of *fbp1* under different culture conditions. (A) Transcript levels of the *fbp1* gene measured by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). RNA was isolated from mycelia obtained after the indicated times of growth in potato dextrose broth (PDB) medium. (B) Transcript levels of *fbp1* under induction (galactose medium) or repression (glucose medium) conditions measured by qRT-PCR analysis. Relative expression levels represent the mean cycle threshold values normalized to actin gene expression levels and relative to the expression values at 72 h (A) or in galactose medium (B) set to unity. Bars represent standard errors calculated from three independent experiments with three replicates each.

penetration assay (Prados Rosales and Di Pietro, 2008). In contrast with the wild-type, the  $\Delta fbp1$  mutant was unable to penetrate cellophane membranes (Fig. 2A), suggesting that Fbp1 is important for invasive growth. Cellophane penetration was restored in the two independent complemented strains. To determine whether Fbp1 is required for the invasive growth of *F. oxysporum* on living host plant tissue, tomato fruits were inoculated by the injection of a microconidial suspension of the different strains into the fruit tissue (Di Pietro *et al.*, 2001). Figure 2B shows the fruit after 4 days of incubation: although the  $\Delta fbp1$  mutant was impaired in invasive growth, the wild-type and complemented strains colonized and rotted the fruit tissue surrounding the site of inoculation.

We next asked whether the absence of Fbp1 affected the ability to infect tomato plants. Roots of tomato seedlings were dip inoculated with microconidia of the wild-type,  $\Delta fbp1$  mutants and *fbp1* complemented strains (Di Pietro and Roncero, 1998). Plants inoculated with the wild-type showed a progressive increase in vascular wilt symptoms, and most were dead 30 days after inoculation (Fig. 2C). Two independent  $\Delta fbp1$  mutants showed reduced virulence, but still produced a low level of wilt symptoms. Virulence was restored in the two complemented strains.

### Two-dimensional gel electrophoresis protein profile of the wild-type and the $\Delta fbp1$ mutant

Our next goal was to investigate the potential proteins targeted by the SCF<sup>Fbp1</sup>-mediated proteolysis pathway. Our starting hypothesis was that, when Fbp1 is defective, the protein targets are not



**Fig. 2** Fbp1 is required for invasive growth and contributes to virulence on tomato plants. (A) Penetration of cellophane membranes. Fungal colonies were grown for 4 days on a plate with minimal medium covered by a cellophane membrane (before); the cellophane with the colony was removed and plates were incubated for an additional day (after). (B) Invasive growth of *Fusarium oxysporum* strains on tomato fruits at the inoculation site after 4 days of incubation at 100% relative humidity and 28 °C. (C) Incidence of *Fusarium* wilt on tomato plants inoculated with the indicated strains. The severity of disease symptoms was recorded at the indicated times after inoculation using an index ranging from 1 (healthy plant) to 5 (dead plant). The data shown are from three representative experiments. Error bars represent the standard error (SE) calculated from 10 plants. wt, wild type.

degraded by the 26S proteasome and thus should exhibit higher abundance in the  $\Delta fbp1$  mutant strain than in the wild-type. Total cellular protein extracts were obtained from germlings grown under the conditions in which  $\Delta fbp1$  was unable to penetrate cellophane membranes. Six replicate gels were run per strain and stained with SYPRO RUBY (Fig. 3). Image analysis with PD-QUEST

software showed significant changes in the expression of 80 proteins, all of which could be identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) [see Experimental Procedures and Table S1 (Supporting Information)]. The proteins were re-annotated by BLAST searches against the *Fusarium* genome database, leading to 46 hits corresponding to 41 unique protein accessions (see Table S2, see Supporting Information). A comparison of the proteomes of the wild-type and the  $\Delta fbp1$  strain revealed 17 protein spots that were always more abundant in the  $\Delta fbp1$  mutant than in the wild-type strain in different batches of protein samples, whereas 24 protein spots were more abundant in the wild-type strain (Table S2).

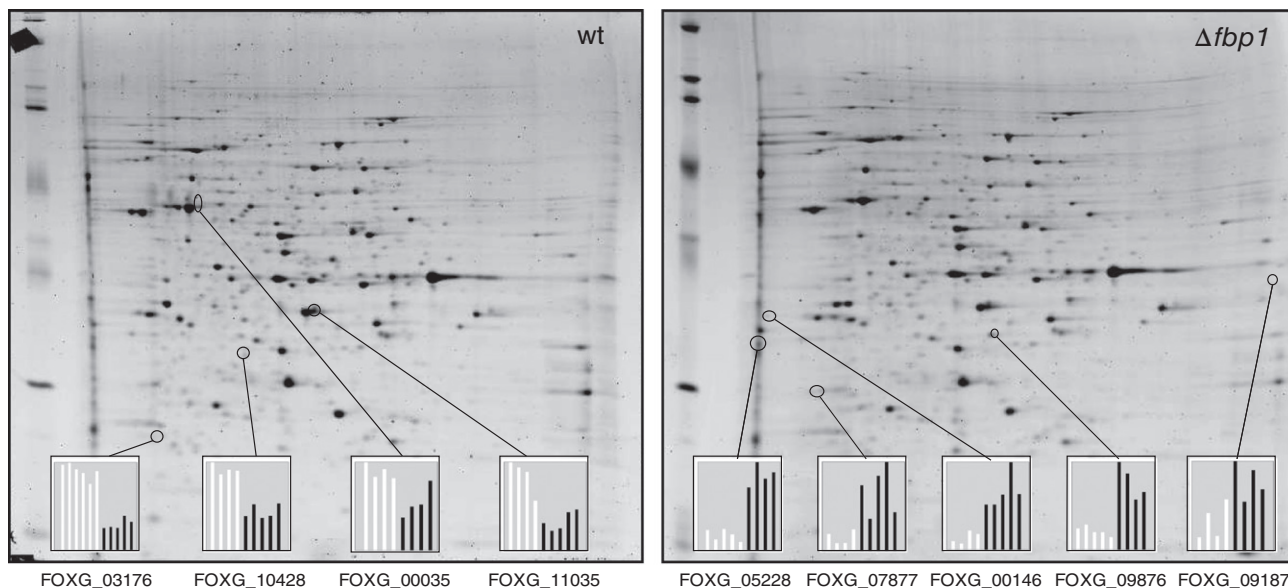
We next assigned the proteins to functional categories according to their involvement in biological processes. The classification was based on gene ontology (GO) using the information from the UniProt-GO Annotation database (<http://www.ebi.ac.uk/GOA>) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) protein interaction pathways (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) to assign the differentially expressed proteins to metabolic pathways.

The classification of proteins by biological process showed 11 different groups. More than 50% of the proteins fell into two categories: (i) oxidation–reduction processes (29%) and (ii) metabolic processes (24%) (Fig. 4A). Interestingly, the majority of the proteins up-regulated in the wild-type strain fell into these two groups. By contrast, proteins up-regulated in the  $\Delta fbp1$  mutant were involved in proteolysis, protein folding, response to stress, cellular component organization, cellular processes and translation (Fig. 4B).

#### Classification of proteins accumulating at a higher level in the $\Delta fbp1$ mutant than in the wild-type strain

Among the protein spots identified, two were involved in vesicular trafficking: (i) the coatomer subunit epsilon, Sec28 (FOXG\_05228), a component of the retrograde pathway belonging to the COPI coat proteins, which are responsible for the biogenesis and sorting of vesicles from the Golgi apparatus and their delivery to the endoplasmic reticulum via retrograde transport (Cai *et al.*, 2007; Cosson *et al.*, 1996; Spang, 2002); and (ii) FOXG\_00146, corresponding to a 14-3-3 protein orthologue to *S. cerevisiae* BMH2. 14-3-3 proteins are dimeric proteins abundant in the cytosol, which interact with a broad array of cellular proteins controlling different cellular processes, including vesicle trafficking (Yuan *et al.*, 2003).

The proteome of the  $\Delta fbp1$  mutant also showed two up-regulated chaperones: FOXG\_00893 (orthologue to *S. cerevisiae* SSB1) and FOXG\_04346, a member of the Hsp90 family of chaperones (Peisker *et al.*, 2010). The Hsp90 chaperone is involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)



**Fig. 3** Two-dimensional images of proteins extracted from the wild-type and the  $\Delta fbp1$  mutant strains of *Fusarium oxysporum*. Two-dimensional gel analysis of proteins extracted from mycelia grown for 8 h on minimal medium (MM) plates, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, and detected by Sypro Ruby staining. Some differentially expressed proteins are indicated in the bottom panels. Bars corresponding to the spot intensity are represented for six different gels.

process which starts with the recognition of a misfolded protein substrate, followed by substrate ubiquitination, and retrotranslocation from the endoplasmic reticulum for degradation by the 26S proteasome (Ciechanover, 2005).

With regard to pathogenicity, one of the most abundant proteins in the  $\Delta fbp1$  mutant, FOXG\_07877, corresponds to a putative adhesin from the HAD superfamily of hydrolases. In the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*, a 32-kDa adhesion protein has been shown to play an important role in adherence and pathogenicity (Gonzalez *et al.*, 2008).

Another differentially regulated protein with a putative function in pathogenicity was FOXG\_12759, orthologue to the cobalamin-independent fungal methionine synthase MET6, essential for complete virulence in the human pathogen *Cr. neoformans* (Pascon *et al.*, 2004).

Both eukaryotic and prokaryotic organisms generate reactive oxygen species (ROS) as by-products of their metabolism, mainly through aerobic respiration. One of the mechanisms that supplies reducing power is the thioredoxin and glutathione redox system. The FOXG\_10111 protein corresponds to a peroxiredoxin, an important class of cellular antioxidants identified in a wide range of organisms (Rhee *et al.*, 2005). FOXG\_09187 is an orthologue of ZTA1, a NADPH-dependent quinone reductase in *S. cerevisiae*. A protein complex between a quinone reductase and the 20S proteasome has been shown recently to stabilize transcription factors by acting as an inhibitor of their proteasomal degradation (Sollner and Macheroux, 2009). Finally, we also identified an alcohol dehydrogenase 2 (FOXG\_12790) and an aldo-keto-reductase

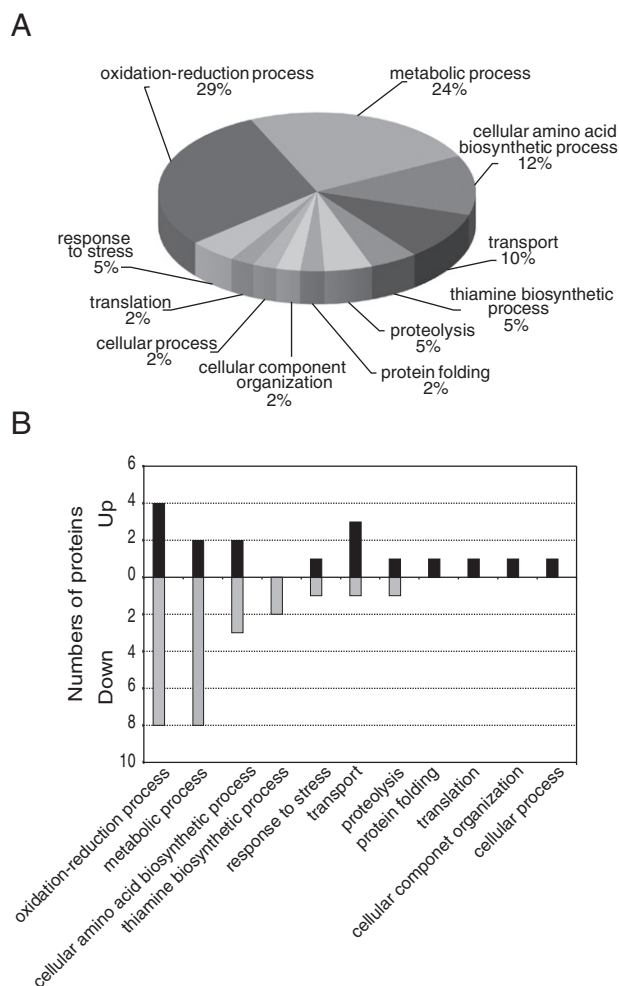
(FOXG\_09876), involved in glycolysis and gluconeogenesis, both of which have been implicated in the oxidative stress response (Aguirre *et al.*, 2005).

#### Proteins with decreased levels in the $\Delta fbp1$ mutant

The largest group of proteins down-regulated in the  $\Delta fbp1$  strain corresponded to proteins involved in oxidation–reduction and metabolic processes (Fig. 4B). Among these were eight oxidoreductases: thioredoxin reductase (FOXG\_00831), uricase (FOXG\_11511), a mitochondrial precursor of D-lactate dehydrogenase 2 (FOXG\_02132) and several unannotated proteins that were identified as belonging to different oxidoreductase families. A phenol 2-monooxygenase (FOXG\_17384) was also overexpressed in the wild-type strain. Phenol 2-monooxygenase is a hydrolase involved in the degradation of phenolic compounds. It is known that a large number of plant antifungal secondary metabolites are phenolic compounds whose detoxification facilitates host colonization by fungi (Michielse *et al.*, 2012).

Primary metabolism proteins constituted the bulk of proteins highly expressed in the wild-type, including enolase (FOXG\_00035), involved in glycolysis and gluconeogenesis, and aconitase (FOXG\_03713), required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle, as well as enzymes involved in amino acid metabolism, such as aspartate-semialdehyde dehydrogenase (FOXG\_03301), which functions in the common pathway for methionine and threonine biosynthesis, *O*-acetylhomoserine (FOXG\_15240), dedicated to the cysteine and methionine biosynthesis pathway, and glutamine





**Fig. 4** Functional classification of differentially expressed proteins. (A) The pie chart depicts the distribution (%) of differentially expressed proteins by functional category families (biological process) estimated from the gene ontology (GO) data in Table S2. (B) Classification of up- and down-regulated proteins in the  $\Delta fbp1$  mutant according to biological process.

synthetase (FOXG\_05182), a key enzyme in the pathway of glutamine biosynthesis from glutamate and ammonia.

Another important metabolic enzyme overexpressed in the wild-type was the *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase Gnt1 (FOXG\_12436). This enzyme plays a role in *S. cerevisiae* in the transfer of GlcNAc to the N-linked glycans attached to nascent glycoproteins, as they are translocated to the endoplasmic reticulum (Yoko-O *et al.*, 2003).

The synthesis of vitamins B6 and B1 was also regulated by Fbp1. The  $\Delta fbp1$  strain showed a lower intensity of the protein spot corresponding to Pdx1 (FOXG\_08652), the orthologue of *S. cerevisiae* SNZ1 functioning in the biosynthesis of vitamin B6. Similarly, two components of the biosynthesis of vitamin B1 (thiamine), the precursor hydroxymethylpyrimidine (FOXG\_11035) and

the thiazole intermediate (FOXG\_10428), were down-regulated in the  $\Delta fbp1$  mutant.

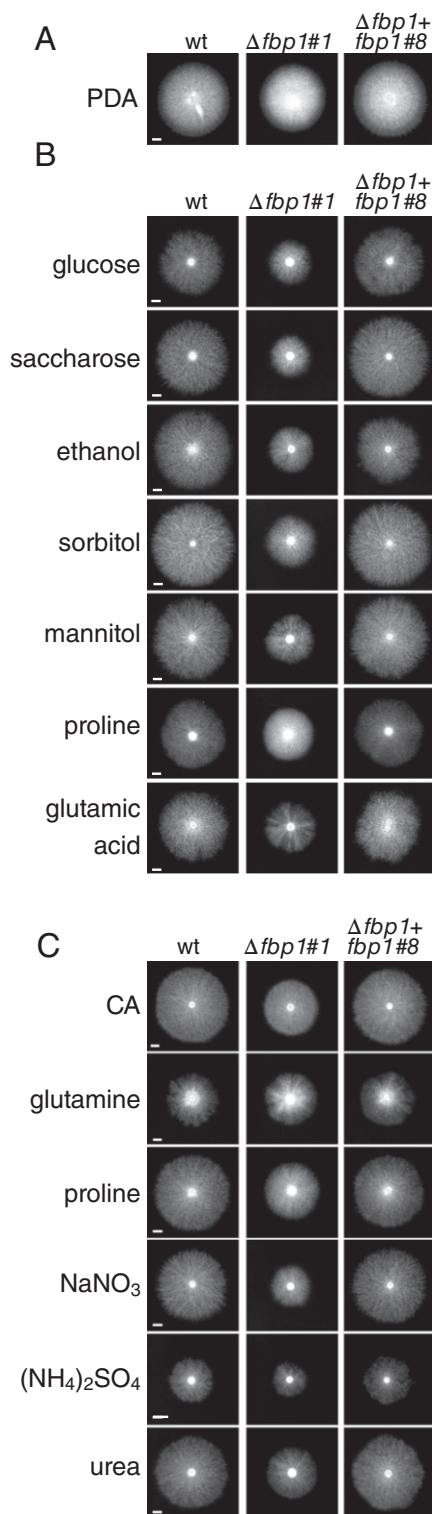
Among the spots overrepresented in the wild-type strain, two corresponded to proteins involved in vacuole fusion and protein transport. The first is FOXG\_08026, identified as an orthologue of SEC17, a t-SNARE protein required for vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi (Haas and Wickner, 1996). The second is the enolase (FOXG\_00035). It has been shown that ENO1 and ENO2 are necessary to induce the homotypic vacuole fusion in *S. cerevisiae* (Decker and Wickner, 2006).

### Fbp1 contributes to growth on solid surfaces under nutrient-limiting conditions

Because carbon and nitrogen metabolism pathways appeared to be attenuated in the  $\Delta fbp1$  strain, we asked whether this down-regulation would result in poor nutrient assimilation in this mutant. Indeed, the  $\Delta fbp1$  mutant showed reduced hyphal growth on all carbon and nitrogen sources analysed (Fig. 5B,C). The radial growth rate of the  $\Delta fbp1$  mutant was reduced in all cases relative to the wild-type, except on glutamine. As glutamine is a preferred source of nitrogen, this result is in line with the findings in our proteomic analysis, suggesting that the assimilation of glutamine is not impaired in the mutant. Moreover, the  $\Delta fbp1$  mutant grew similarly to the wild-type strain on complete medium, such as potato dextrose agar (PDA) (Fig. 5A). Collectively, these results suggest that  $\Delta fbp1$  is impaired in nutrient assimilation.

### Fbp1 is involved in directional growth on solid medium

Hyphal orientation, an essential aspect of polarized growth in fungi, is determined by the continuous flow of secretion vesicles from the hyphal cell body to the hyphal tip, resulting in cell wall and membrane extension (Gow *et al.*, 2002). One of the characteristics of filamentous fungi is the presence of the Spitzenkörper (Spk), a highly dynamic vesicle supply centre adjacent to the site of polarized cell extension (Harris *et al.*, 2005). As mentioned previously, some differentially expressed proteins in our proteomic analysis are involved in vesicle trafficking. In order to determine whether Fbp1 contributes to hyphal orientation in colony development, we compared the hyphal growth pattern of the  $\Delta fbp1$  mutant and the wild-type on solid medium. In the mutant strain, leader hyphae displayed a zig-zag growth phenotype relative to straight hyphae in the wild-type and complemented strains, compatible with a defect in directional growth (Fig. 6A,B). This meandering phenotype was quantified by counting wavy leader hyphae in independent growing colonies. We obtained 100% of wavy hyphae from a population of about 200 mutant hyphae. In contrast, all of the analysed leader hyphae in the wild-type and complemented strains displayed the straight phenotype. We next



**Fig. 5** Effect of *fbp1* deletion on carbon and nitrogen utilization in *Fusarium oxysporum*. Growth of the indicated strains on potato dextrose agar (PDA) (A), on minimal medium with different carbon sources (B) and on minimal medium with different nitrogen sources (C) (see Experimental procedures). CA, casaminoacids; wt, wild-type. Bars, 5 mm.

questioned whether the growing tips had a defined Spk. For this purpose, we stained growing hyphae with FM4-64, which has been used in several fungi to stain Spk (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Penalva, 2005). Spk appeared to be well defined in the growing tips of the wild-type and complemented strains, whereas abundant and delocalized staining was observed in the  $\Delta fbp1$  mutant (Fig. 6C).

## DISCUSSION

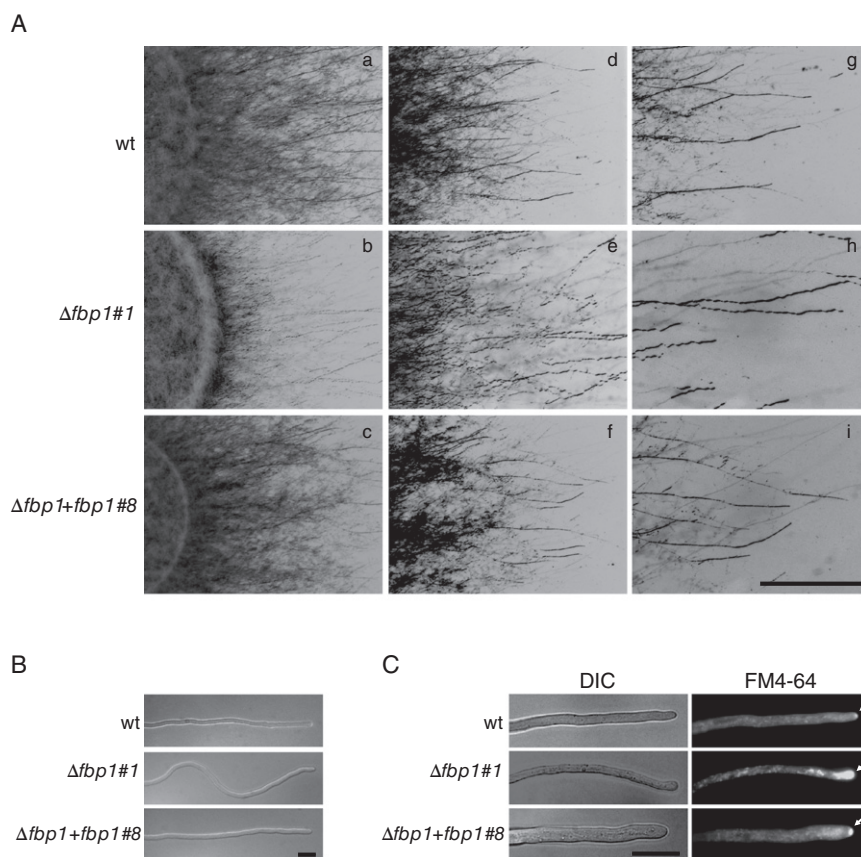
### Fbp1 governs invasive growth and virulence in *F. oxysporum*

In this work, we have shown that Fbp1 is essential for invasive growth and virulence in *F. oxysporum*. *Fusarium oxysporum* Fbp1 shares sequence and structural similarities with Grr1 in *C. albicans* and Fbp1 in *F. graminearum* and *Cr. neoformans* (Fig. S1). As several orthologues of GRR1 in other plant-pathogenic fungi have also been reported to play a role in fungal pathogenicity, the involvement of F-box proteins in virulence appears to be conserved in fungal pathogens.

The  $\Delta fbp1$  mutants were impaired in invasive growth on cellophane membranes and on tomato fruit tissue. Both phenotypes have been related to the Fmk1 pathogenicity mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in *F. oxysporum*. Three different key components of the Fmk1 MAPK cascade, the Fmk1 protein (MAPK), the transcription factor Ste12 and the mucin-like transmembrane protein Msb2, are essential to invasive growth and to the complete virulence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Di Pietro *et al.*, 2001; Perez-Nadales and Di Pietro, 2011; Rispail and Di Pietro, 2009). Here, we show that the  $\Delta fbp1$  mutant shares the invasive growth phenotype with the  $\Delta fmk1$ ,  $\Delta ste12$  and  $\Delta msb2$  knockout mutants, suggesting that Fbp1 may promote invasive growth by controlling the levels of one or several of the Fmk1 MAPK pathway components. The link between MAPK signalling and protein degradation to control signalling specificity, which defines growth versus differentiation, has been shown previously in *S. cerevisiae* (Bao *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004, 2006, 2008; Molina *et al.*, 2010). Future work is needed to determine the possible involvement of Fbp1 in the Fmk1 MAPK signalling cascade of *F. oxysporum*.

### Potential targets of SCF<sup>Fbp1</sup> involved in primary metabolism and oxidation–reduction

Fbp1 has been reported to be a versatile F-box protein participating in the formation of the SCF complex, which controls regulatory processes for major traits in *Gibberella zeae*, including sexual reproduction and virulence (Han *et al.*, 2007). Several lines of evidence suggest that Fbp1 also participates in the development and virulence of *Cr. neoformans* (Liu *et al.*, 2011). Nevertheless,



**Fig. 6** Effect of *fbp1* deletion on directional hyphal growth of *Fusarium oxysporum*.

(A) Growth phenotypes at the edge of the fungal colony (a–i). Scale bar, 1 mm.

(B) Optical images showing meandering growth in a leader hypha of the  $\Delta fbp1$  strain. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

(C) FM4-64 staining reveals that the  $\Delta fbp1$  mutant is defective in the formation of the Spitzenkörper. White arrow indicates Spitzenkörper. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . DIC, differential interference contrast image; wt, wild-type.

nothing is known so far about the proteins targeted by the SCF<sup>Fbp1</sup> complex for proteasomal degradation.

We reasoned that the proteins involved in invasive growth should be differentially expressed in the  $\Delta fbp1$  mutant strain. As mentioned previously, invasive growth resembles root adhesion in being associated with virulence functions of *F. oxysporum* (Prados-Rosales *et al.*, 2009). Interestingly, 19 of the 41 proteins differentially expressed in the present work were also found in a previous proteomic study which identified 174 expressed proteins from *F. oxysporum* cell walls under adhesion-inducing conditions, including those with a known biochemical function in primary metabolism, such as enolase and pyruvate decarboxylase PdcA (Prados-Rosales *et al.*, 2009).

The 41 differentially expressed proteins detected here are involved in a plethora of biological processes, most related to the oxidation–reduction process and primary metabolism (Fig. 4A, Table S2). It is known that GRR1 (Spielewoy *et al.*, 2004) plays a role in both glucose and amino acid signalling by targeting Yck1/2-phosphorylated pathway components for ubiquitination by SCF<sup>GRR1</sup>. In a proteomic screen developed by Benanti *et al.* (2007), seven new metabolic targets of SCF<sup>GRR1</sup> were identified, including two regulators of glycolysis. These results demonstrated that the glycolytic–gluconeogenic switch was regulated by targets of

SCF<sup>GRR1</sup>. We identified three proteins involved in this pathway, two up-regulated in  $\Delta fbp1$  (Pdc1 and Adh2) and one up-regulated in the wild-type strain (Eno1). Some of the up-regulated proteins in the  $\Delta grr1$  mutant belong to coordinately transcribed groups, such as the regulators of methionine biosynthesis, suggesting that some are transcriptionally regulated (Benanti *et al.*, 2007). In our work, two enzymes involved in the biosynthesis of methionine were identified [MET6 (FOX\_12795) and MET17 (FOXG\_15240)], which were up- and down-regulated, respectively, in  $\Delta fbp1$ . Although the expression of these proteins was transcriptionally regulated, the regulators may be SCF<sup>Fbp1</sup> controlled and targeted to degradation. Fbp1 regulates primary metabolism, as deduced by the results of proteomic analysis, but also by phenotypic growth assays (Fig. 5). The reduced radial colony growth observed on different nutrient sources suggests that certain metabolic pathways are affected in the  $\Delta fbp1$  mutant strain.

The second major class of differentially expressed proteins was related to the oxidation–reduction process. ROS play a major role in pathogen–plant interactions. Recognition of a pathogen by the plant rapidly triggers the oxidative burst, which is necessary for further defence reactions. Protection against oxidative stress is also required for normal fungal development, because a transient

increase in ROS levels acts as an internal signal for developmental progression (Aguirre *et al.*, 2005). The role of the up-regulated oxido-reductases identified in the wild-type proteome might thus be related to the reduced virulence observed in the mutant strain.

### **Fbp1 contributes to directional hyphal growth and may participate in the ubiquitination of proteins involved in vesicle trafficking**

Approximately half of the proteins more abundant in the *Δfbp1* mutant are involved in a variety of cellular processes that are susceptible to ubiquitination: transport, proteolysis, response to stress and cellular component organization. Classically, polyubiquitination is a signal that directs proteins to the proteasome, where ubiquitin is recycled and the protein is degraded (Hershko and Ciechanover, 1992). Nevertheless, ubiquitination also affects nonproteasomal functions, such as endocytosis (Hicke and Riezman, 1996; Kolling and Hollenberg, 1994; Mukhopadhyay and Riezman, 2007), where monoubiquitination is sufficient as an endocytic internalization signal (Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997; Terrell *et al.*, 1998). In yeasts and other fungi, endocytosis and intracellular transport events are important for cellular functions, including polarity establishment, hyphal growth and virulence (Atkinson *et al.*, 2002; Dou *et al.*, 2011; Read and Kalkman, 2003; Shaw *et al.*, 2011; Wang and Shen, 2011)

Intracellular transport implies the transfer of material between organelles, which is mediated by carrier vesicles that continually bud from one membrane and fuse with another. Vesicle budding is mediated by protein coats that cycle on and off membranes: COPI (coat protein complex I) and COPII (coat protein complex II) mediate vesicle transport in the early secretory pathway (Cai *et al.*, 2007). The final steps in vesicle-mediated membrane trafficking are the tethering and fusion of the vesicle with its target membrane. Fusion is thought to occur by the pairing of SNAREs, a family of membrane proteins (Chen and Scheller, 2001). COPI vesicles mediate the retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum, as well as intra-Golgi transport. We have shown here that one of the up-regulated proteins in the *Δfbp1* mutant is Sec28, the orthologue of the human  $\epsilon$ -COP subunit. A recent model for the SEC28 trafficking pathway in yeast suggests that UBC1 (ubiquitin ligase 1) controls the concentration of SEC28 at the vacuolar membrane (Brown *et al.*, 2008). We further found that the t-SNARE protein Sec17 was up-regulated in the wild-type strain. It has been shown previously in yeast that SEC28 and SEC17 are involved in vesicle formation and membrane fusion, respectively. We consider that Fbp1 could be implicated in these processes in *F. oxysporum*. FM4-64 staining of Spk indicates that secretory carriers reaching this structure recycle endocytosed membrane to the apex, implicating this recycling in apical extension (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Recent studies on the molecular machinery regulating hyphal orientation have shown that muta-

tions that affect these processes result in hyphae that have either abnormal meandering trajectories or attenuated tropic responses (Brand and Gow, 2009). Mutation in two cell-end marker proteins, TeaA and TeaC, of *A. nidulans* resulted in a zig-zag hyphal phenotype (Higashitsuji *et al.*, 2009), underscoring the importance of these proteins in hyphal orientation. We found that Fbp1 is important for correct Spk formation and directional growth, as suggested by the zig-zag pattern of *Δfbp1* hyphae (Fig. 6).

Our proteomic approach revealed a range of *F. oxysporum* proteins whose orthologues were shown to be ubiquitinated in *S. cerevisiae* (Table S3, see Supporting Information). Interestingly, among the proteins up-regulated in the *Δfbp1* mutant, only one, Dbp5, has not been shown previously to be ubiquitinated in yeast (Venancio *et al.*, 2009; Ziv *et al.*, 2011). Metabolic proteins (Eno1) and heat shock proteins (Ssb) have also been shown to be ubiquitinated in a proteomic study in *C. albicans* (Leach *et al.*, 2011). Moreover a number of spots identified in our work correspond to proteins that have been co-purified with the 20S proteasome in *Trichoderma reesei* (Grinyer *et al.*, 2007; Kautto *et al.*, 2009). Among these are the unfolded protein response (UPR) proteins, such as chaperones, and proteasome-interacting proteins (PiPs), including 14-3-3-like protein, thioredoxin and actin. The t-SNARE protein SEC17 is also associated with the 20S proteasome (Kautto *et al.*, 2009)

It remains to be demonstrated whether the identified *F. oxysporum* proteins are indeed ubiquitinated and regulated by the proteasome. However, our results are consistent with the hypothesis that proteins detected as differentially expressed in our proteomic approach are regulated by Fbp1 and thus susceptible as potential targets of ubiquitination and proteasome degradation by the SCF<sup>Fbp1</sup> system.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Fungal isolates and culture conditions**

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 wild-type 4287 (FGSC 9935) was used in all experiments. All fungal strains were stored as microconidial suspensions at  $-80^{\circ}\text{C}$  with 30% glycerol. For the extraction of DNA, microconidia production and fungal development, cultures were grown in liquid PDB at  $28^{\circ}\text{C}$  with shaking at 170 rpm (Di Pietro and Roncero, 1998). For protein extraction,  $5 \times 10^8$  freshly obtained microconidia from each strain were inoculated into 50 mL of PDB. After 12 h of incubation at  $28^{\circ}\text{C}$  and 170 rpm, mycelia were harvested, washed three times in sterile water, resuspended in 4 mL of sterile water and transferred onto two minimal medium (MM) (Puhalla, 1985) agar plates. The plates were incubated for 8 h at  $28^{\circ}\text{C}$ , and the mycelia were harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For colony growth analysis, drops of water with  $2 \times 10^4$  microconidia were spotted onto PDA plates (Difco, Detroit, MI, USA) or MM agar containing the indicated carbon or nitrogen sources. The plates were incubated for 4 days at  $28^{\circ}\text{C}$  and scanned. All experiments included three replicate plates and were performed three times with similar results.

## Nucleic acid manipulations and targeted gene knockout

Total RNA and genomic DNA were extracted from *F. oxysporum* mycelia following previously reported protocols (Chomczynski and Sacchi, 1987; Raeder and Broda, 1985). DNA was treated with appropriate restriction enzymes and subject to Southern hybridization analysis following the standard protocols (Di Pietro and Roncero, 1998) using the nonisotopic digoxigenin labelling kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Real-time qRT-PCR analysis was performed as described previously (Lopez-Berges *et al.*, 2010) using iQ SYBR Green Supermix in an iCycler iQ real-time PCR System (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gene-specific primers (Table S4, see Supporting Information) were designed to flank an intron. The relative levels of the RT-PCR products were determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen, 2001).  $C_t$  values were normalized to the  $C_t$  value of the actin gene.

An *fbp1* mutant allele was generated by fusion PCR (Yang *et al.*, 2004). For targeted *fbp1* gene knockout, protoplasts of *F. oxysporum* 4287 strain were transformed and hygromycin-resistant transformants were analysed (see Fig. S1).

## Light and fluorescence microscopy

To examine hyphal morphology, fungal strains were grown for 36 h on MM agarose (3%) plates and observed in a Leica DMR microscope (Heerbrugg, St. Gallen, Switzerland) or a Zeiss binocular microscope (Oberkochen, Germany). Photographs were recorded with a Leica DC 300F digital camera or an AxioCam Icc 1. The vital dye FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a marker of the Spk in mature hyphae. The edge of the colony was cut and placed on a slide, and MM liquid (20  $\mu$ L) containing FM4-64 (4.5  $\mu$ M as working solution concentration) was placed over it. The slice was covered with a coverslip, and the samples were kept at room temperature in the dark for 15 min and then analysed.

## Protein extraction, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE) and gel analysis

Germlings from PDB cultures were obtained as described above, transferred onto MM agar plates and incubated at 28 °C for the indicated time periods. Mycelia were harvested, frozen in liquid nitrogen, ground in a mortar and resuspended in protein extraction buffer [10% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecylsulphate (SDS), 1% Triton, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), Protease inhibitor cocktail P8215, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]. The samples were kept on ice for 30 min and the supernatant was harvested by centrifugation at 11 336 *g* for 10 min at 4 °C. Samples were washed using the methanol–chloroform method, as described previously (Wessel and Flugge, 1984). The pellet was dried and resuspended in 1  $\times$  CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate) buffer (7 M urea, 2 M thiourea and 4% w/v CHAPS). The protein concentration of the supernatant was determined with the Bio-Rad Bradford reagent using bovine serum albumin (BSA) as a standard. 2D PAGE was performed by vertical electrophoresis. Total fungal proteins (150  $\mu$ g per gel) were loaded onto immobilized pH gradient strips

(immobilized, pH 5–8, linear gradient) by overnight active rehydration with immobilized pH gradient (IPG) (17 cm, Bio-Rad). Isoelectric focusing (IEF) was performed using the Protean IEF Cell System (Bio-Rad) at 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h, 30 min ramping to 8000 V and maintenance at 8000 V until 50 000 V h. The strips were then incubated with equilibration buffer 1 [375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol and 2% dithiothreitol (DTT)] and buffer 2 (375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol, 2% DTT and 2.5% iodoacetamide) for 15 min each. Second dimension SDS-PAGE was run on 11% polyacrylamide gels (26 cm  $\times$  20 cm) using the Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Separation was carried out at 8 °C for 30 min at 30 V and then at 60 V until the dye front reached the bottom of the gel. After electrophoresis, the gels were stained with Sypro Ruby (SYPRO® Ruby Protein Stains, Bio-Rad) stain according to the manufacturer's protocol. Gel images were obtained by a Molecular Imager FX Pro Plus Multi-Imager System (Bio-Rad) using a wavelength of 535 nm. Scans were acquired at 100  $\mu$ m resolution. The digitized images were analysed with PDQUEST software (version 8.0.1, Bio-Rad).

## In-gel digestion and protein identification

The protein spots were automatically excised from the gels using an Investigator™ ProPic (Genomic Solutions, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) station. The digestion protocol of Schevchenko *et al.* (1996) was employed, with minor variations, using a ProPrep II (Genomic Solutions) digestion station. Gel plugs were de-stained by incubation (twice for 30 min) with a solution containing 200 mM ammonium bicarbonate in 40% acetonitrile at 37 °C. They were then subjected to three consecutive dehydration–rehydration cycles with pure acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate in 40% acetonitrile, respectively, and finally dried over 4 h at room temperature. Then, 20  $\mu$ L trypsin, at a concentration of 12.5 ng/ $\mu$ L in 25 mM ammonium bicarbonate, was added to the dry gel pieces and the digestion was performed at 37 °C for 12 h. The digestion was stopped and the peptides were extracted from the gel plugs by the addition of 1  $\mu$ L of 10% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and incubation for 15 min. The peptide fragments from digested proteins were desalted and concentrated using  $\mu$ C-18 ZipTip columns (Millipore, Billerica, MA, USA) and loaded directly onto the MALDI plate using  $\alpha$ -cyanohydroxycinnamic acid as a matrix.

MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analyses were performed in a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The instrument was operated in reflector mode, with an accelerating voltage of 20 kV and in the *m/z* range 800–4000. Spectra were internally calibrated with peptides from trypsin autolysis ( $M + H = 842.509$ ,  $M + H^+ = 2211.104$ ). The most abundant peptide ions were then subjected to fragmentation analysis (MS/MS), providing information that can be used to determine the peptide sequence.

A combined PMF search (MS plus MS/MS) was performed using GPS Explorer™ software v3.5 (Applied Biosystems) over the *F. oxysporum* genome database ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/)) employing the Mascot 2.0 search engine (Matrix Science Ltd., London, UK; <http://www.matrixscience.com>). The following parameters were set for searching: taxonomy restriction to fungus, a minimum of four peptide matches, a maximum of one missed cleavage with the selected trypsin enzyme, an MS/MS fragment tolerance of 0.2 Da, a pre-

cursor mass tolerance of 100 ppm, and cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation as possible modifications. The confidence in the peptide mass fingerprinting matches was based on the score level and confirmed by the accurate overlapping of the matched peptides with the major peaks of the mass spectrum. Proteins with a statistically significant value ( $P < 0.05$ ) were positively assigned identification after considering  $M_i$  and  $pI$  values. Hypothetical proteins with unknown function were annotated by BLAST search in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Protein identifications are documented in Table S2. The chromosome location of the genes encoding the identified proteins was determined by searching in the *F. oxysporum* database. The proteomic (two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF) analysis was carried out in the Universidad de Córdoba-Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación proteomics facility, a member of the Carlos III Networked Proteomics Platform, ProteoRed-ISCIll.

### Bioinformatics prediction

The *F. oxysporum* Fbp1 protein was identified by a BLASTP search in the *Fusarium* Comparative Database of the Broad Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html)) with the *F. graminearum* Fbp1 protein sequence. The identification of putative GRR1 orthologues from different fungi was carried out by a BLASTP search in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). AlignX was used to generate the sequence alignment shown in Fig. S1. The protein domain predictions were made using the Prosite database (ExPASy; Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

### Accession numbers

The accession numbers are as follows: M59247 (*Saccharomyces cerevisiae* Grr1); CAD21405 (*Neurospora crassa* Grr1); DQ309327 (*Aspergillus nidulans* GrrA); XP722013 (*Candida albicans* Grr1); FOXG\_04438 (*Fusarium oxysporum* Fbp1); FGSG\_02095 (*Fusarium graminearum* Fbp1); and CNAG\_05280.2 (*Cryptococcus neoformans* Fbp1).

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Esther Martínez (University of Córdoba, Spain) for valuable technical assistance. We thank Dr Angela Moreno and Dr Gema Sanz (University of Córdoba, Spain) for help with the proteomics analysis, Dr Gabriela Roca for help with microscopic analysis and Professor Antonio Di Pietro for helpful suggestions and critical reading of the manuscript. The research in our laboratory was supported by Grants BIO2010-15505, BIO2008-04479-E and EUI2009-03942 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). CM-R has a PhD fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

The authors declare that no conflict of interest exists.

### REFERENCES

Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D. and Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* **13**, 111–118.

Atir-Lande, A., Gildor, T. and Kornitzer, D. (2005) Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2772–2785.

Atkinson, H.A., Daniels, A. and Read, N.D. (2002) Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet. Biol.* **37**, 233–244.

Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates, J.R., 3rd and Madhani, H.D. (2004) Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell*, **119**, 991–1000.

Benanti, J.A., Cheung, S.K., Brady, M.C. and Toczyski, D.P. (2007) A proteomic screen reveals SCFGrr1 targets that regulate the glycolytic–gluconeogenic switch. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1184–1191.

Bernard, F. and Andre, B. (2001) Ubiquitin and the SCF(Grr1) ubiquitin ligase complex are involved in the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **496**, 81–85.

Blondel, M., Galan, J.M. and Peter, M. (2000) Isolation and characterization of HRT1 using a genetic screen for mutants unable to degrade Gic2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **155**, 1033–1044.

Brand, A. and Gow, N.A. (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 350–357.

Brown, C.R., Wolfe, A.B., Cui, D. and Chiang, H.L. (2008) The vacuolar import and degradation pathway merges with the endocytic pathway to deliver fructose-1,6-bisphosphatase to the vacuole for degradation. *J. Biol. Chem.* **283**, 26 116–26 127.

Butler, D.K., All, O., Goffena, J., Loveless, T., Wilson, T. and Toenjes, K.A. (2006) The GRR1 gene of *Candida albicans* is involved in the negative control of pseudohyphal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 573–582.

Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S. (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell*, **12**, 671–682.

Chen, Y.A. and Scheller, R.H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 98–106.

Chen, Z.J. and Sun, L.J. (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell*, **33**, 275–286.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.

Chou, S., Huang, L. and Liu, H. (2004) Fus3-regulated Tec1 degradation through SCFCdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell*, **119**, 981–990.

Chou, S., Lane, S. and Liu, H. (2006) Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4794–4805.

Chou, S., Zhao, S., Song, Y., Liu, H. and Nie, Q. (2008) Fus3-triggered Tec1 degradation modulates mating transcriptional output during the pheromone response. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 212.

Ciechanover, A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 79–87.

Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. and Letourneur, F. (1996) Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J.* **15**, 1792–1798.

Decker, B.L. and Wickner, W.T. (2006) Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J. Biol. Chem.* **281**, 14 523–14 528.

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.

Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F.I., Meglecz, E. and Roncero, M.I. (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.D., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M.I. (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 315–325.

Dou, X., Wang, Q., Qi, Z., Song, W., Wang, W., Guo, M., Zhang, H., Zhang, Z., Wang, P. and Zheng, X. (2011) MoVam7, a conserved SNARE involved in vacuole assembly, is required for growth, endocytosis, ROS accumulation, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One*, **6**, e16439.

Duyvesteyn, R.G., van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B.J. and Haring, M.A. (2005) Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Mol. Microbiol.* **57**, 1051–1063.

Fischer-Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A. and Read, N.D. (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* **198**, 246–259.

- Flick, J.S. and Johnston, M. (1991) GRR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5101–5112.
- Galan, J.M. and Haguenaer-Tsapris, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* **16**, 5847–5854.
- Gonzalez, A., Caro, E., Munoz, C., Restrepo, A., Hamilton, A.J. and Cano, L.E. (2008) *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. *Microb. Pathog.* **44**, 389–401.
- Gordon, T.R. and Martyn, R.D. (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 111–128.
- Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 366–371.
- Grinyer, J., Kautto, L., Traini, M., Willows, R.D., Te'o, J., Bergquist, P. and Nevalainen, H. (2007) Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. *Curr. Genet.* **51**, 79–88.
- Haas, A. and Wickner, W. (1996) Homotypic vacuole fusion requires Sec17p (yeast alpha-SNAP) and Sec18p (yeast NSF). *EMBO J.* **15**, 3296–3305.
- Haglund, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* **24**, 3353–3359.
- Han, Y.K., Kim, M.D., Lee, S.H., Yun, S.H. and Lee, Y.W. (2007) A novel F-box protein involved in sexual development and pathogenesis in *Gibberella zeae*. *Mol. Microbiol.* **63**, 768–779.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. and Momany, M. (2005) Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot. Cell*, **4**, 225–229.
- He, Q. and Liu, Y. (2005) Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin–proteasome pathway. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 953–956.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., He, Q., Yu, H. and Liu, Y. (2003) FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.* **22**, 4421–4430.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761–807.
- Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277–287.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. and Fischer, R. (2009) The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, **8**, 957–967.
- Jonkers, W. and Rep, M. (2009) Lessons from fungal F-box proteins. *Eukaryot. Cell*, **8**, 677–695.
- Kautto, L., Grinyer, J., Birch, D., Kapur, A., Baker, M., Traini, M., Bergquist, P. and Nevalainen, H. (2009) Rapid purification method for the 26S proteasome from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Protein Expr. Purif.* **67**, 156–163.
- Kawadler, H. and Yang, X. (2006) Lys63-linked polyubiquitin chains: linking more than just ubiquitin. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1273–1274.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I. and Dikic, I. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell*, **34**, 259–269.
- Kodadek, T. (2010) No splicing, no dicing: non-proteolytic roles of the ubiquitin–proteasome system in transcription. *J. Biol. Chem.* **285**, 2221–2226.
- Kolling, R. and Hollenberg, C.P. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**, 3261–3271.
- Krappmann, S., Jung, N., Medic, B., Busch, S., Prade, R.A. and Braus, G.H. (2006) The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol. Microbiol.* **61**, 76–88.
- Kumar, A. and Paietta, J.V. (1998) An additional role for the F-box motif: gene regulation within the *Neurospora crassa* sulfur control network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2417–2422.
- Leach, M.D., Stead, D.A., Argo, E., MacCallum, D.M. and Brown, A.J. (2011) Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **79**, 1574–1593.
- Li, W.J., Wang, Y.M., Zheng, X.D., Shi, Q.M., Zhang, T.T., Bai, C., Li, D., Sang, J.L. and Wang, Y. (2006) The F-box protein Grr1 regulates the stability of Ccn1, Cln3 and Hof1 and cell morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **62**, 212–226.
- Liu, T.B., Wang, Y., Stukes, S., Chen, Q., Casadevall, A. and Xue, C. (2011) The F-Box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*, **10**, 791–802.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>−(Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Lopez-Berges, M.S., Rispaill, N., Prados-Rosales, R.C. and Di Pietro, A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, **22**, 2459–2475.
- Madrid, M.P., Di Pietro, A. and Roncero, M.I. (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.
- Madhus, I.H. (2006) Ubiquitin binding in endocytosis—how tight should it be and where does it happen? *Traffic*, **7**, 258–261.
- Michielse, C.B. and Rep, M. (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 311–324.
- Michielse, C.B., Reijnen, L., Olivain, C., Alabouvette, C. and Rep, M. (2012) Degradation of aromatic compounds through the beta-ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 1089–1100.
- Molina, M., Cid, V.J. and Martin, H. (2010) Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast*, **27**, 503–511.
- Mosesson, Y. and Yarden, Y. (2006) Monoubiquitylation: a recurrent theme in membrane protein transport. *Isr. Med. Assoc. J.* **8**, 233–237.
- Mukhopadhyay, D. and Riezman, H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, **315**, 201–205.
- Nucci, M. and Anaissie, E. (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 695–704.
- Pascon, R.C., Ganous, T.M., Kingsbury, J.M., Cox, G.M. and McCusker, J.H. (2004) *Cryptococcus neoformans* methionine synthase: expression analysis and requirement for virulence. *Microbiology*, **150**, 3013–3023.
- Peisker, K., Chiabudini, M. and Rospert, S. (2010) The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 662–672.
- Penalva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 963–975.
- Perez-Nadales, E. and Di Pietro, A. (2011) The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, **23**, 1171–1185.
- Prados Rosales, R.C. and Di Pietro, A. (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell*, **7**, 162–171.
- Prados-Rosales, R., Luque-Garcia, J.L., Martinez-Lopez, R., Gil, C. and Di Pietro, A. (2009) The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. *Proteomics*, **9**, 4755–4769.
- Puhalla, J.E. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative incompatibility. *Can. J. Bot.* **63**, 5.
- Raeder, U. and Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letts. Appl. Microbiol.* **1**, 4.
- Read, N.D. and Kalkman, E.R. (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol.* **39**, 199–203.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z. and Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1543–1552.
- Rispaill, 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.
- Saksena, S., Sun, J., Chu, T. and Emr, S.D. (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 561–573.
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 3.
- Shaw, B.D., Chung, D.W., Wang, C.L., Quintanilla, L.A. and Upadhyay, S. (2011) A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol.* **115**, 541–546.
- Sollner, S. and Macheroux, P. (2009) New roles of flavoproteins in molecular cell biology: an unexpected role for quinone reductases as regulators of proteasomal degradation. *FEBS J.* **276**, 4313–4324.
- Spang, A. (2002) ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 423–427.
- Spielewoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T.I., Walker, J.R. and Wittenberg, C. (2004) Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8994–9005.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Farrall, L., Chumley, F.G. and Valent, B. (1998) *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**, 404–412.

- Terrell, J., Shih, S., Dunn, R. and Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell*, **1**, 193–202.
- Thomson, T.M. and Guerra-Rebollo, M. (2010) Ubiquitin and SUMO signalling in DNA repair. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 116–131.
- Venancio, T.M., Balaji, S., Iyer, L.M. and Aravind, L. (2009) Reconstructing the ubiquitin network: cross-talk with other systems and identification of novel functions. *Genome Biol.* **10**, R33.
- Wang, P. and Shen, G. (2011) The endocytic adaptor proteins of pathogenic fungi: charting new and familiar pathways. *Med. Mycol.* **49**, 449–457.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141–143.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P., Dou, X., Perez-Balaguer, A. and Osmani, S.A. (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, **3**, 1359–1362.
- Yoko-O, T., Wiggins, C.A., Stolz, J., Peak-Chew, S.Y. and Munro, S. (2003) An N-acetylglucosaminyltransferase of the Golgi apparatus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that can modify N-linked glycans. *Glycobiology*, **13**, 581–589.
- Yuan, H., Michelsen, K. and Schwappach, B. (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.* **13**, 638–646.
- Ziv, I., Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Erpapazoglou, Z., Leon, S., Pantazopoulou, M., Kim, W., Gygi, S.P., Haguenaer-Tsapis, R., Reis, N., Glickman, M.H. and Kleifeld, O. (2011) A perturbed ubiquitin landscape distinguishes between ubiquitin in trafficking and in proteolysis. *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.009753.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1** The *fbp1* gene product of *Fusarium oxysporum* represents an F-box protein that is conserved in fungi. (A) Schematic illustration of the *F. oxysporum* Fbp1 protein. F-box, F-box domain; LRRs, leucine-rich repeats; aa, amino acids. The positions of the amino acid residues at the domain boundaries are indicated. (B, C) Amino acid sequence alignment of the region spanning the F-box (B) and LRR motifs (C) in *Saccharomyces cerevisiae* (ScGrr1), *Candida*

*albicans* (CaGrr1), *Cryptococcus neoformans* (CnFbp1), *Aspergillus nidulans* (AnGrrA), *Neurospora crassa* (NcGrr1), *Fusarium graminearum* (FgFbp1) and *Fusarium oxysporum* (FoFbp1). Positions in the primary structure of the respective proteins are indicated on the left. Highly conserved residues are shaded in black, moderately conserved residues are shaded in dark grey and slightly conserved residues are shaded in light grey.

**Fig. S2** Targeted replacement of the *Fusarium oxysporum fbp1* gene. (A) Physical maps of the *fbp1* locus and the targeted gene disruption construct obtained by fusion polymerase chain reaction (PCR). The relative positions of the *Bam*HI restriction enzyme and the primers used for PCR are indicated. *hyg<sup>r</sup>*, hygromycin resistance gene; *PgpdA*, *gpdA* promoter; *TtrpC*, *trpC* terminator (both from *Aspergillus nidulans*). (B) PCR amplification of genomic DNA of four independent transformants, using primers *fbp1-3* and *hph2* (Table S4). (C) Southern blot analysis. Genomic DNA of the wild-type strain and four transformants was treated with the indicated restriction enzyme, separated on a 0.7% agarose gel, transferred to a nylon membrane and hybridized with the DNA probe indicated in (A). (D) PCR amplification of genomic DNA of the wild-type strain,  $\Delta$ *fbp1* mutant and three independent complemented transformants, using primers *fbp1-1* and *fbp1-2* (Table S4).

**Table S1** Data obtained for the identification of 80 spots with  $P < 0.05$  in Student's *t*-test.

**Table S2** Differentially expressed proteins in the  $\Delta$ *fbp1* mutant and the wild-type strain identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS).

**Table S3** Proteins identified in this work which have been analysed previously for ubiquitination.

**Table S4** Primers used in this study.