



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

**Determinantes moleculares que participan en la
interacción *Fusarium oxysporum* – tomate**

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

Yolanda Pareja Jaime

Dirigido por

Dra. M. Isabel González Roncero

Dra. Carmen Ruiz Roldán

Córdoba 2009

TITULO: *Determinantes moleculares que participan en la interacción Fusarium oxysporum - tomate*

AUTOR: *YOLANDA PAREJA JAIME*

© 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
publicaciones@uco.es

Dña. M. Isabel González Roncero, Catedrática del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba

Dña. Carmen Ruiz Roldán, Investigadora Doctora del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba

Informan:

Que el trabajo titulado “**Determinantes moleculares que participan en la interacción *Fusarium oxysporum* – tomate**” realizado por Dña. **Yolanda Pareja Jaime** bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expedimos el siguiente informe
Córdoba, 13 de Octubre de 2009

M. Isabel González Roncero

Carmen Ruiz Roldán

**Departamento de Genética
Universidad de Córdoba**

Dña. Ángeles Alonso Moraga, Directora del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba

Informa:

Que el trabajo titulado “**Determinantes moleculares que participan en la interacción *Fusarium oxysporum* – tomate**” realizado por Dña. **Yolanda Pareja Jaime** bajo la dirección de Dña. M. Isabel González Roncero y Dña. Carmen Ruiz Roldán, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expido el siguiente informe
Córdoba, 13 de Octubre de 2009

Ángeles Alonso Moraga

**Departamento de Genética
Universidad de Córdoba**

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y financiado por el MEC (BIO2004-00276 y BIO2007-62661), la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia AGR-209, grupo BIO-138), y la Universidad de Córdoba (Programa Propio de Ayuda a la Investigación). YPJ ha sido beneficiaria de una beca FPU del MEC.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directoras de tesis, Reyes y Carmen, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo y haber depositado en mí toda su confianza y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

También me gustaría agradecer a todas las chicas y chicos del laboratorio, y a los mayores, por haber compartido conmigo los buenos momentos, haberme prestado vuestra ayuda siempre que la he necesitado, y haberme enseñado tantas cosas. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros. Vuestra generosidad y compañerismo a lo largo de todos estos años será algo que siempre recordaré. Mi agradecimiento también para nuestros vecinos de veterinaria y al grupo de Angelines, así como a M. Carmen por su ayuda.

Por último, me gustaría dedicar este trabajo a toda mi familia, por su ánimo, apoyo, comprensión y confianza.

Índice general

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 7 |
| 1. Interacción planta – patógeno..... | 9 |
| 2. Interacción hongo – planta..... | 10 |
| 2.1. Mecanismos de ataque..... | 10 |
| 2.1.1. Penetración de la planta..... | 10 |
| 2.1.2. Colonización del interior de la planta..... | 11 |
| 2.2. Mecanismos de defensa de las plantas..... | 12 |
| 2.2.1. Reconocimiento del patógeno..... | 13 |
| 2.2.2. Defensas estructurales..... | 14 |
| 2.2.3. Defensas químicas..... | 15 |
| 2.2.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR)..... | 17 |
| 3. El género <i>Fusarium</i> | 17 |
| 3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> | 18 |
| 3.1.1. Biología..... | 18 |
| 3.1.2. Ciclo de vida..... | 19 |
| 3.1.3. El proceso de infección..... | 20 |
| 3.1.4. Genes esenciales para la patogénesis..... | 23 |
| 3.1.5. Control de la fusariosis..... | 26 |
| OBJETIVOS | 27 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| 1. Materiales..... | 33 |
| 1.1. Material biológico..... | 33 |
| 1.2. Medios..... | 34 |
| 1.2.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 1.2.2. Medios de cultivo para <i>Fusarium oxysporum</i> | 34 |
| 1.3. Compuestos químicos..... | 35 |
| 1.4. Oligonucleótidos sintéticos..... | 36 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5. Vectores de clonación..... | 39 |
| 1.6. Programas para el análisis de datos..... | 39 |
| 2. Métodos..... | 41 |
| 2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos..... | 41 |
| 2.1.1. Bacterias | 41 |
| 2.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> | 41 |
| 2.1.3. Plantas | 41 |
| 2.2. Aislamiento de ácidos nucleicos | 42 |
| 2.2.1. Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 42 |
| 2.2.2. Extracción de ADN de <i>F. oxysporum</i> | 43 |
| 2.2.3. Extracción de ADN de plantas infectadas..... | 43 |
| 2.2.4. Extracción de ARN total de <i>F. oxysporum</i> | 44 |
| 2.2.5. Extracción de ARN a partir de raíces de plantas infectadas | 45 |
| 2.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos | 45 |
| 2.3.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción | 45 |
| 2.3.2. Defosforilación | 46 |
| 2.3.3. Unión de fragmentos de ADN | 46 |
| 2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos..... | 47 |
| 2.4.1. Geles de agarosa..... | 47 |
| 2.4.2. Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa..... | 47 |
| 2.4.3. Geles con formaldehído..... | 48 |
| 2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos | 48 |
| 2.6. Hibridación y detección de ácidos nucleicos | 48 |
| 2.6.1. Transferencia y fijación de ADN a membranas | 48 |
| 2.6.2. Transferencia de ARN a membranas | 49 |
| 2.6.3. Prehibridación | 50 |
| 2.6.4. Hibridación | 50 |
| 2.6.5. Lavados y detección | 50 |
| 2.6.6. Retirada de la sonda y rehibridación | 51 |
| 2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 52 |
| 2.7.1. PCR estándar..... | 52 |
| 2.7.2. Precipitación con isopropanol de los productos de PCR..... | 52 |
| 2.7.3. Mutagénesis mediante superposición..... | 53 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.4. Cuantificación <i>in planta</i> de ADN genómico de <i>F. oxysporum</i> mediante PCR a tiempo real | 54 |
| 2.7.5. Transcripción inversa de ARN (RT-PCR) | 55 |
| 2.7.6. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo final | 56 |
| 2.7.7. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real | 56 |
| 2.7.8. PCR de marcaje | 58 |
| 2.8. Transformación genética | 58 |
| 2.8.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> | 58 |
| 2.8.2. Transformación genética de <i>F. oxysporum</i> | 60 |
| 2.9. Construcción de alelos mutantes | 62 |
| 2.9.1. Construcción de alelos interrumpidos | 62 |
| 2.9.2. Construcción de alelos con expresión constitutiva | 64 |
| 2.10. Ensayos de infección | 65 |
| 2.10.1. Infección de plantas | 65 |
| 2.10.2. Infección de frutos de tomate | 67 |
| 2.11. Ensayo de actividad tomatinasa | 67 |
| 2.12. Cromatografía en capa fina (TLC) | 68 |
| 2.13. Ensayo de sensibilidad a α -tomatina | 68 |
| 2.14. Detección de actividad quitinasa | 69 |
| 2.15. Ensayo de inhibición fúngica | 69 |
| 2.16. Análisis filogenético | 70 |

CAPÍTULO 1: La enzima tomatinasa es necesaria para la virulencia completa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción | 73 |
| 2. Resultados | 76 |
| 2.1. Interrupción dirigida del gen <i>tom1</i> | 76 |
| 2.2. Expresión constitutiva del gen <i>tom1</i> | 77 |
| 2.3. Actividad tomatinasa | 79 |
| 2.4. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de degradación de la α -tomatina | 80 |
| 2.5. Sensibilidad de los mutantes a la α -tomatina | 81 |
| 2.6. Comportamiento patotípico de los mutantes <i>tom1</i> | 82 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7. Identificación de nuevos genes tomatinasa en el genoma de <i>F. oxysporum</i> | 83 |
| 3. Discusión..... | 87 |

CAPÍTULO 2: Bases moleculares de la avirulencia del mutante $\Delta chsV$ de *F. oxysporum*, deficiente en la síntesis de quitina..... 91

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introducción..... | 93 |
| 2. Resultados..... | 97 |
| 2.1. Co-inoculación de plantas de tomate con la estirpe silvestre y el mutante no patógeno $\Delta chsV$ de <i>F. oxysporum</i> | 97 |
| 2.2. Cuantificación de la biomasa fúngica en plantas infectadas con las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$ | 100 |
| 2.3. Ensayos de inhibición fúngica..... | 104 |
| 2.4. Expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de plantas en raíces de plantas coinfectadas..... | 105 |
| 2.5. Detección de la actividad quitinasa en raíces de plantas co-infectadas..... | 107 |
| 2.6. Expresión de genes de <i>F. oxysporum</i> , responsables de enzimas hidrolíticas de pared celular, durante la infección de plantas de tomate..... | 108 |
| 3. Discusión..... | 110 |

CAPÍTULO 3: Aislamiento y caracterización del gen *con7-1*, un factor regulador del crecimiento y la patogénesis en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*..... 115

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introducción..... | 117 |
| 2. Resultados..... | 119 |
| 2.1. Identificación y caracterización de ortólogos <i>con7</i> en <i>F. oxysporum</i> | 119 |
| 2.2. Procesamiento diferencial de intrones en el gen <i>con7-1</i> | 120 |
| 2.3. Interrupción dirigida del gen <i>con7-1</i> en <i>F. oxysporum</i> | 122 |
| 2.4. Interrupción dirigida de los genes <i>con7-2</i> y <i>con7-3</i> en <i>F. oxysporum</i> | 123 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$ | 124 |
| 2.5.1. Infección de plantas de tomate | 124 |
| 2.5.2. Crecimiento sobre frutos de tomate..... | 126 |
| 2.5.3. Capacidad de adhesión a raíces de tomate del mutante $\Delta con7-1$ | 126 |
| 2.6. Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$ | 128 |
| 2.6.1. Crecimiento en medio sólido y líquido | 128 |
| 2.6.2. Sensibilidad del mutante $\Delta con7-1$ a factores de estrés abiótico. ... | 132 |
| 2.6.3. Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en diferentes fuentes de carbono..... | 133 |
| 2.7. Expresión de genes relacionados con pared en los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$ | 134 |
| 3. Discusión..... | 136 |
| CONCLUSIONES | 139 |
| BIBLIOGRAFÍA | 143 |
| PUBLICACIONES | 163 |

Índice de Figuras

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Esporas de <i>Fusarium</i> | 19 |
| Figura 2: Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i> | 20 |
| Figura 3: Adhesión y penetración de la raíz por <i>F. oxysporum</i> | 21 |
| Figura 4: Mecanismo de infección de <i>F. oxysporum</i> | 22 |
| Figura 5: Esquema de mutagénesis mediante superposición | 53 |
| Figura 6: Esquema de construcción de vectores de interrupción génica. | 63 |
| Figura 7: Esquema de construcción del alelo constitutivo <i>tom1^C</i> | 65 |
| Figura 8: Índice de enfermedad en plantas de tomate. | 66 |
| Figura 9: Molécula de α -tomatina..... | 74 |
| Figura 10: Interrupción dirigida del gen <i>tom1</i> de <i>F. oxysporum</i> | 76 |
| Figura 11: Expresión constitutiva del gen <i>tom1</i> de <i>F. oxysporum</i> | 78 |
| Figura 12: Análisis de expresión del gen <i>tom1</i> | 79 |
| Figura 13: Actividad tomatinasa en estirpes de <i>F. oxysporum</i> | 80 |
| Figura 14: Análisis TLC de los productos de degradación de la α -tomatina. 81 | |
| Figura 15: Efecto de la α -tomatina en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> | 82 |
| Figura 16: Comportamiento patotípico de los mutantes <i>tom1</i> | 83 |
| Figura 17: Alineamiento de secuencias deducidas de genes tomatinasas. . | 84 |
| Figura 18: Arbol filogenético de la enzimas tomatinasas de <i>F. oxysporum</i> .. | 85 |
| Figura 19: Expresión de los genes <i>tom1</i> , <i>tom2</i> , <i>tom3</i> , <i>tom4</i> y <i>tom5</i> | 86 |
| Figura 20: Esquema de la pared fúngica. | 94 |
| Figura 21: La pared celular de <i>F. oxysporum</i> | 95 |
| Figura 22: Morfología y pared celular del mutante $\Delta chsV$ | 96 |
| Figura 23: Micrografías de raíces de plantas infectadas con $\Delta chsV$ | 96 |
| Figura 24: Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate co-infectadas con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ | 98 |
| Figura 25: Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate co-infectadas con la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta fmk1$ o $\Delta gas1$ | 99 |
| Figura 26: Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate inoculadas secuencialmente con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ | 100 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 27: Curva estándar para calcular el contenido de ADN de <i>Fusarium</i> . | 101 |
| Figura 28: Cuantificación <i>in planta</i> del ADN de <i>Fusarium</i> . | 102 |
| Figura 29: Curvas estándar para calcular el contenido de ADN de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta chsV$. | 103 |
| Figura 30: Cuantificación <i>in planta</i> del ADN de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta chsV$. | 104 |
| Figura 31: Inhibición del crecimiento fúngico entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$. | 105 |
| Figura 32: Expresión de genes de defensa en plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i> . | 106 |
| Figura 33: Actividad endoquitinasa en plantas de tomate infectadas con <i>F. oxysporum</i> . | 108 |
| Figura 34: Expresión de genes de enzimas hidrolíticas en plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i> . | 109 |
| Figura 35: Representación del motivo dedo de zinc C_2H_2 . | 118 |
| Figura 36: Alineamiento de proteínas Con7. | 119 |
| Figura 37: Procesamiento diferencial de intrones en <i>con7-1</i> . | 121 |
| Figura 38: Interrupción dirigida del gen <i>con7-1</i> de <i>F. oxysporum</i> . | 122 |
| Figura 39: Interrupción dirigida de los genes <i>con7-2</i> y <i>con7-3</i> de <i>F. oxysporum</i> . | 124 |
| Figura 40: Virulencia de las estirpes $\Delta con7$ de <i>F. oxysporum</i> . | 125 |
| Figura 41: Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en frutos de tomate. | 126 |
| Figura 42: Adhesión de $\Delta con7-1$ a raíces de tomate. | 127 |
| Figura 43: Crecimiento micelial de $\Delta con7-1$. | 128 |
| Figura 44: Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$. | 129 |
| Figura 45: Porcentaje de Germinación del mutante $\Delta con7-1$. | 130 |
| Figura 46: Conidiación del mutante $\Delta con7-1$. | 131 |
| Figura 47: Análisis del crecimiento del mutante $\Delta con7-1$. | 132 |
| Figura 48: Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en presencia de agentes de estrés abiótico. | 133 |
| Figura 49: Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en fuentes de carbono. | 134 |
| Figura 50: Expresión de genes de biosíntesis en los mutantes $\Delta con7-1$. | 135 |

Indice de Tablas

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Genes de <i>F. oxysporum</i> estudiados mediante interrupción dirigida..... | 24 |
| Tabla 2: Material biológico empleado..... | 33 |
| Tabla 3: Compuestos químicos utilizados..... | 35 |
| Tabla 4: Oligonucleótidos generales..... | 36 |
| Tabla 5: Oligonucleótidos específicos de <i>F. oxysporum</i> | 36 |
| Tabla 6: Oligonucleótidos específicos de genes de plantas..... | 39 |
| Tabla 7: Vectores utilizados..... | 39 |
| Tabla 8: Programas para el análisis de datos..... | 39 |
| Tabla 9: Condiciones estándar de PCR..... | 52 |
| Tabla 10: Condiciones de amplificación de la PCR a tiempo real para la cuantificación <i>in planta</i> de <i>F. oxysporum</i> | 55 |
| Tabla 11: Condiciones de amplificación en el análisis de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real..... | 57 |

Resumen

En este trabajo se ha investigado sobre las bases moleculares que determinan la patogenicidad del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate, estudiando particularmente la importancia de la detoxificación de compuestos antifúngicos producidos por las plantas de tomate, así como la relación entre la morfogénesis del patógeno y el desarrollo de la enfermedad.

Las enzimas detoxificadoras de saponinas, producidas por hongos patógenos, están implicadas en el proceso de infección de sus plantas hospedadoras. *F. oxysporum* produce la enzima tomatinasa Tom1, que degrada la α -tomatina hasta derivados menos tóxicos. Para estudiar el papel del gen *tom1* en la virulencia de *F. oxysporum*, se ha llevado a cabo la interrupción dirigida y la expresión constitutiva del gen en la estirpe silvestre del hongo. El proceso de infección de plantas de tomate inoculadas con transformantes del hongo con expresión constitutiva de la enzima Tom1 resulta en un incremento en el desarrollo de los síntomas de enfermedad. Por el contrario, las plantas de tomate infectadas con los mutantes deficientes en el gen muestran un retraso en el proceso de infección, lo que indica que Tom1, aunque no es esencial para la patogenicidad, es necesaria para la virulencia completa de *F. oxysporum*. La actividad tomatinasa total en las estirpes deficientes ($\Delta tom1$) se ve reducida solo un 25%, y se observa β_2 -tomatina como el mayor producto de hidrólisis de la saponina *in vitro*. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* revela la existencia de cuatro posibles genes responsables de otras tantas tomatinasas con identidad a otras ortólogas de la familia 3 de glicosil hidrolasas. Los productos de estos genes podrían ser los responsables de la actividad tomatinasa reminiscente en los mutantes $\Delta tom1$, y por tanto, la detoxificación de la α -tomatina en *F. oxysporum* sería llevada a cabo por varias actividades enzimáticas independientes, lo que sugiere la importancia de estas enzimas durante el proceso de infección.

En otro capítulo, se ha estudiado si la causa de la avirulencia del mutante $\Delta chsV$ de *F. oxysporum*, deficiente en un gen sintasa de quitina de

clase V y capaz de penetrar la planta y colonizar los tejidos internos de la raíz, se debe a una rápida elicitación de la respuesta de defensa de la planta, que conduce a una restricción del crecimiento fúngico. La co-inoculación de plantas de tomate con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ resulta en una reducción significativa del desarrollo de los síntomas de enfermedad, lo que sugiere que este mutante ejerce un mecanismo protector. La colonización de la planta por la estirpe silvestre queda restringida durante la co-inoculación, como demuestran los ensayos de cuantificación de la biomasa fúngica mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La hipótesis de que la respuesta de defensa de la planta se activa rápidamente por el mutante $\Delta chsV$ se ha comprobado mediante el análisis de la expresión de algunos genes relacionados con la defensa usando RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Además, plantas de tomate inoculadas con el mutante $\Delta chsV$ muestran un incremento en la actividad quitinasa en comparación con plantas inoculadas con la estirpe silvestre. Estos resultados sugieren que la alteración de los componentes de la pared celular podría resultar en una elicitación de la respuesta de defensa de la planta.

El tercer capítulo se ha centrado en el estudio de los factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo morfológico de los hongos patógenos, esencial para su proceso de infección. En este trabajo se han identificado tres genes parálogos *con7*, denominados *con7-1*, *con7-2* y *con7-3*, ortólogos al gen *con7* del patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*, que determina un factor de transcripción esencial para el desarrollo de estructuras de penetración de la planta y la patogénesis fúngica. Esta proteína regula la expresión de varios genes importantes para la morfogénesis y la patogenicidad en *M. grisea*, incluyendo un gen sintasa de quitina de clase VI. Los tres genes *con7* de *F. oxysporum* conservan el dominio de unión al ADN así como la señal de localización nuclear y una región "coiled-coil". La inactivación dirigida del gen *con7-1* revela su importancia para la morfogénesis y para el proceso de infección de *F. oxysporum*. Los mutantes nulos muestran alteraciones en el crecimiento polarizado y la formación de ramificaciones, y no producen síntomas de enfermedad en plantas de tomate. Sin embargo, el análisis de la expresión de varios genes de biosíntesis de

pared, incluidos los genes *chs*, revela que el factor Con7 de *F. oxysporum* no regula la transcripción de los mismos.

Introducción

general

1. Interacción planta – patógeno

Las interacciones entre plantas y patógenos han tenido un impacto profundo en la historia de las civilizaciones, debido a las graves pérdidas ocasionadas por epidemias de enfermedades en plantas cultivadas, causadas sobre todo por hongos. En el presente, los patógenos siguen causando daños importantes en los cultivos a nivel mundial (alrededor de un 15% de la cosecha total), a pesar de los esfuerzos realizados para disminuir la incidencia de las enfermedades o la severidad de sus síntomas. En la actualidad esto depende en gran medida del empleo de pesticidas, que por otro lado, causan graves problemas de contaminación ambiental y la aparición de cepas resistentes. El conocimiento a nivel molecular de las interacciones planta-patógeno es fundamental para entender los mecanismos que regulan el proceso de infección y poder aplicar dicho conocimiento para la protección de los cultivos, evitando el uso de dañinos agentes químicos.

La interacción planta-patógeno es un proceso complejo, con diversos estadios en los que intervienen los mecanismos de reconocimiento a distintos niveles. La combinación de todos ellos determina el éxito o el 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 y evite la infección.

Las plantas pueden ser infectadas por una amplia diversidad de patógenos (virus, bacterias, hongos o insectos). En este trabajo nos vamos a centrar en el estudio de la interacción entre los hongos y las plantas (Jackson y Taylor, 1996).

2. Interacción hongo – planta

A pesar de que los hongos patógenos también pueden vivir fuera del hospedador de forma saprófita, en general desarrollan su ciclo de vida en el interior de la planta a la que parasitan. Este hecho hace que sean considerados como organismos necrotrofos, debido a que su papel es obtener de forma rápida los nutrientes de la planta, aunque ésta muera, no necesitando mantener vivas a las células vegetales para poder completar su ciclo vital (Agrios, 1997).

2.1. Mecanismos de ataque

2.1.1. Penetración de la planta

Tras detectar la presencia de la planta hospedadora, las esporas del hongo germinan produciendo un tubo de germinación que crece sobre la superficie de las células vegetales. Para ello, las esporas utilizan como nutrientes los compuestos que tienen almacenados, pero requieren penetrar al interior de la planta para obtener nuevos nutrientes (Jackson y Taylor, 1996).

Los hongos han desarrollado numerosas estrategias para la penetración de la planta, invadir sus tejidos y propagarse en su interior. Son capaces de penetrar cualquier tejido vegetal y, a diferencia de otros, 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 cualquier zona aérea se encuentran con la cutícula de cutina, una barrera que debe ser superada por la acción enzimática de enzimas cutinasas y/o mediante la formación de estructuras de infección especializadas o apresorios, que gracias a la incorporación de melanina en su pared, proporcionan la presión necesaria para atravesar la superficie exterior (Agrios, 1997). Por el contrario, en

patógenos del suelo no es tan frecuente la formación de apresorios. La penetración a través de la raíz requiere, por su parte, la acción de enzimas encargadas de la degradación de la pared celular primaria.

Los patógenos fúngicos son muy versátiles en la producción de enzimas extracelulares capaces de degradar la pared vegetal (Di Pietro *et al.*, 2009). Ésta está formada por una capa de cutina, otra de celulosa, otra de pectina y otra de hemicelulosas, como el xilano o el glucano, además de proteínas con diversas funciones (Carpita y Gibeaut, 1993). Para degradar cada compuesto existen enzimas líticas específicas producidas por los patógenos fúngicos. Algunas de estas enzimas actúan como exo-enzimas, liberando monómeros o dímeros de los extremos del polímero, o como endo-enzimas, cortando al azar en el interior del polímero. Estas últimas degradan más rápidamente la pared vegetal, pero son los monómeros liberados por las exo-enzimas los que sirven inicialmente como nutrientes.

Los hongos, mediante regulación génica, producen las enzimas líticas necesarias para degradar los polímeros que haya en el medio, y de esta forma ahorran energía (Di Pietro *et al.*, 2009). Los patógenos poseen una cantidad basal de enzimas líticas que degradan los polímeros que encuentran y generan los monómeros correspondientes. Éstos se unen a los receptores específicos del hongo y desencadenan la activación de los factores de transcripción necesarios para la expresión de los genes estructurales de las enzimas líticas adecuadas. Como los componentes de la pared celular vegetal se disponen por capas, en primer lugar se expresan las enzimas cutinasas, a continuación expresan las celulasas, y así sucesivamente hasta la hidrólisis de todos los componentes.

2.1.2. Colonización del interior de la planta

Tras la penetración, los hongos colonizan el interior de la planta creciendo a través de los espacios intercelulares y pasando de una célula a otra. Generalmente en esta fase tiene lugar la secreción de fitotoxinas, compuestos análogos a hormonas vegetales que alteran la fisiología de la

planta en beneficio del patógeno. Ello implica la liberación de nutrientes de las células vegetales y la supresión de la defensa de la planta (Agrios, 1997). Las fitotoxinas producidas por hongos necrotrofos generan principalmente necrosis. Algunas toxinas pueden ser muy específicas y afectar solo al hospedador, como la T-toxina producida por patógenos de maíz del género *Cochliobolus* (Lu *et al.*, 1994), mientras que otras resultan ser generales, y afectan rutas conservadas en plantas, como ocurre con la fusicoccina generada por *Fusicoccum amygdali*, un patógeno del almendro (Ballio *et al.*, 1964).

Muchos fitopatógenos no sólo secretan potentes toxinas contra sus hospedadores, sino que pueden producir también enzimas que a su vez detoxifican las toxinas vegetales. Una de estas enzimas muy bien estudiada es la avenacinasa de *Gaeumannomyces graminis var. avenae*, que degrada específicamente la toxina avenacina producida por la planta de avena (Bowyer *et al.*, 1995).

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

2.2. Mecanismos de defensa de las plantas

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

2.2.1. Reconocimiento del patógeno

El ataque del patógeno desencadena una serie de respuestas en la planta. Éstas detectan la presencia de los microorganismos mediante receptores de membrana que reconocen moléculas generadas durante la interacción entre la planta y el patógeno, conocidas como elicitores. Los elicitores se definen como macromoléculas originadas en la propia planta (endógenos) o en el patógeno (exógenos), capaces de inducir en la planta cambios estructurales o respuestas bioquímicas asociados con la expresión de la resistencia a la enfermedad (Benhamou, 1996). Un número variado de elicitores fúngicos han sido identificados, como son diferentes glicoproteínas, oligómeros de la quitina y del glucano de la pared celular fúngica, péptidos y ergosterol u otros lípidos de membrana (Benhamou, 1996). Los elicitores endógenos son compuestos que, a pesar de tener su origen en la planta, se producen exclusivamente durante el ataque del patógeno, como los oligogalacturónidos, fragmentos de pectina liberados de la pared celular vegetal por la acción de las enzimas pectinolíticas del patógeno (Côté y Hahn, 1994).

A pesar de que la unión de los elicitores a los receptores de las plantas parece ser específica, la respuesta de la planta ante diferentes patógenos es parecida. Esto se debe a que las señales que se inducen convergen para activar una respuesta de defensa común (Benhamou, 1996; Hammond-kosack y Jones, 1996). En general, los dominios extracelulares de los receptores de los elicitores identificados son diferentes, pero los dominios citoplásmicos están muy conservados.

Las principales moléculas involucradas en la transducción de la señal de defensa de la planta parecen ser los iones calcio (Ca^{+2}) (Stab, 1987), el etileno, el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el ácido abscísico. El objetivo final de estos compuestos es la activación de la expresión de los genes involucrados en el desarrollo de la defensa, y con ello, todos los mecanismos para impedir la invasión del patógeno. Estas moléculas activan rutas que se entrecruzan entre sí. De esta forma, tras la detección del patógeno, se

produce un conjunto de señales que determinará la magnitud de la respuesta de la planta y su efectividad en detener la infección (Benhamou, 1996).

Las plantas también sintetizan compuestos capaces de convertir factores de patogenicidad fúngicos en señales de la activación de la defensa. Esto ocurre en el caso de las endopoligalacturonasas de hongos y los inhibidores de estas enzimas producidos por plantas (PGIPs). Estas enzimas líticas fúngicas se encargan de degradar la pectina de la pared vegetal hasta oligogalacturónidos con actividad elicitora de la respuesta de defensa, pero que pueden ser rápidamente degradados hasta oligómeros inactivos. Pues bien, las PGIPs de plantas evitan la degradación de los oligogalacturónidos hasta compuestos inertes, aumentando su concentración y en consecuencia la respuesta de defensa de la planta (Cervone, 1990). Esto pone de manifiesto la complejidad de la interacción entre patógenos y plantas.

2.2.2. Defensas estructurales

Las plantas utilizan barreras físicas para limitar la entrada y la invasión del patógeno. La superficie de la planta constituye la primera línea de defensa frente al patógeno. Toda la superficie aérea de la planta está recubierta por una cutícula de cutina, un poliéster de ácidos grasos hidroxiepoxi impregnado en mayor o menor cantidad por ceras (Agrios, 1997), que actúa como un impermeabilizante al agua y a los microorganismos. Esta primera barrera de defensa es constitutiva, es decir, está presente aunque no haya presencia de patógenos, y por tanto, no es específica del patógeno.

Una vez que el patógeno llega al interior de la planta, ésta genera una serie de barreras físicas para restringir el avance de los patógenos. Este tipo de defensa se basa en la formación de engrosamientos en las paredes celulares de la planta, constituidos por calosa y lignina, en posibles sitios de penetración o en lugares en los que se encuentra el hongo para impedir que progrese hacia el interior (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Estas barreras estructurales y no constitutivas se inducen con la presencia del patógeno.

2.2.3. Defensas químicas

Toxinas

Las plantas producen una batería de sustancias tóxicas para los microorganismos, sintetizadas bien como consecuencia del propio metabolismo de las plantas, o bien a través de una serie de reacciones dirigidas a la producción de las mismas (Osbourn, 1996; Morrissey y Osbourn, 1999; Bednarek y Osbourn, 2009). Estas toxinas de plantas se clasifican como fitoanticipinas, si se producen de forma constitutiva, como la α -tomatina de las plantas de tomate (Roddick, 1977) o la avenacina producida por la avena (Bowyer *et al.*, 1995); o como fitoalexinas, compuestos tóxicos que se inducen en la planta en mayor cantidad cuando hay infección, como la pisatina del guisante (Matthews y van Etten, 1983) o la phaseolina de las judías (Zhang y Smith, 1983).

Las plantas producen constitutivamente numerosos compuestos con actividad antimicrobiana: fenilpropanoides, glicósidos, compuestos azufrados, glucosinolatos o dienos (Prusky y Keen, 1993). Algunos de ellos existen en la planta en sus formas activas, mientras que otros solo se activan en respuesta al ataque del patógeno o a daños tisulares. Una enzima clave para generar estos compuestos tóxicos es la fenilalanina amonio-liasas (PAL), que transforma la fenilalanina en ácido cinámico, del cual derivan todos los fenilpropanoides sencillos mediante reacciones de hidroxilación, mutilación y deshidratación (Dixon y Paiva, 1995).

Las fitoalexinas suponen un menor gasto de energía para la planta, pero las fitoanticipinas, al estar siempre presentes, protegen a la planta ante cualquier patógeno aunque ésta no haya detectado su presencia.

Especies reactivas de oxígeno

Otro tipo de defensas químicas producidas por las plantas son las especies reactivas de oxígeno (EROs), como el agua oxigenada. Estos compuestos se sintetizan como consecuencia de la infección por un patógeno, y a concentraciones elevadas, también pueden resultar tóxicos para la propia planta (Lamb y Dixon, 1997; Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Proteínas relacionadas con la patogénesis

Por último, entre los mecanismos de defensa de las plantas inducidos por la infección de patógenos destacan la síntesis y acumulación de proteínas relacionadas con las patogénesis (proteínas PR) (Van Loon, 1999). Estas proteínas no solo se acumulan localmente, sino que son inducidas sistémicamente, y se piensa que, colectivamente, su función está relacionada con la inhibición del crecimiento del patógeno, su multiplicación y su expansión en el interior de la planta. Se conocen numerosas proteínas relacionadas con la patogénesis, agrupadas en más de 10 familias, entre las que destacan enzimas necesarias para la lisis de las paredes celulares fúngicas, como las hidrolasas quitinasas (PR-3, -4, -8, -11) y glucanasas (PR-2), las proteasas (PR-7) que degradan proteínas de la pared, o las proteínas con homología a las permatinas (PR-5), que permeabilizan las membranas fúngicas. También se han descrito como proteínas PR algunas peroxidases (PR-9), que participan en la deposición de lignina como refuerzo de las paredes celulares vegetales. Otras proteínas muy estudiadas son la familia 1 de proteínas PR. Se trata de proteínas extracelulares de función desconocida pero que cuentan con actividad antimicrobiana (Van Loon, 1999).

Las proteínas PR no sólo se expresan en presencia de patógenos, sino también cuando la planta se ve sometida a algunos tipos de estrés abiótico o en presencia de microorganismos no patógenos.

Reacción de hipersensibilidad

La reacción de hipersensibilidad es un tipo de respuesta de defensa basada en la muerte rápida de las células que rodean el sitio de infección, es decir, la planta suicida algunas de sus células para detener el avance del microorganismo (Lamb y Dixon, 1997). Esta respuesta está asociada a un conjunto de modificaciones metabólicas que incluyen la alteración del flujo de iones en la membrana plasmática vegetal, la generación de especies reactivas de oxígeno, cambios en la fosforilación de algunas proteínas reguladoras y la activación de la transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta. Como resultado, las células de la planta mueren, se

produce una acumulación local de fitoalexinas y se refuerza pared celular gracias a la deposición en ella de calosa, lignina y suberina (Lamb y Dixon, 1997).

2.2.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

Así se conoce a la inmunidad de las plantas. Después de una primera infección, la planta reacciona rápidamente cuando de nuevo llega el mismo u otro patógeno relacionado (Dixon y Lamb, 1990). La respuesta frente a la primera y a la segunda infección es la misma, pero la segunda se produce de forma más rápida debido a que las células están preparadas para detener la infección. Esto se produce porque las moléculas señal que se generan tras una primera infección se acumulan durante varios días, y además, como suelen ser de pequeño tamaño, difunden sin dificultad por toda la planta, llegando a zonas alejadas del sitio de infección y activando allí la defensa.

3. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos ascomicetos (clase Sordariomycetes, orden Hipocreales, familia Nectriaceae). Se encuentra ampliamente distribuido, e incluye numerosas especies, la mayoría de ellas patógenas vegetales capaces de causar marchitez vascular en un gran número de cultivos y producir toxinas letales para algunos animales (Moss y Smith, 1984). También incluye estirpes no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluido el ser humano (Vartivarian *et al.*, 1993; Ortopeda *et al.*, 2004). Algunas especies pueden completar el ciclo sexual, mientras que la mayoría presenta reproducción asexual. Debido a las graves pérdidas económicas originadas por la infección con esta especie, y a la facilidad para su cultivo y manejo en el laboratorio, se ha suscitado un gran interés en el estudio de los mecanismos de infección de este patógeno de raíz que lo ha convertido en un excelente modelo de experimentación para conocer el proceso de patogénesis. Además, recientemente se han desarrollado diversas herramientas genómicas que mejoran la investigación en esta especie, entre las que destacan la completa

secuenciación y anotación del genoma de *Fusarium graminearum* (Cuomo *et al.*, 2007), *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* aislado 4287 por el Broad Institute (<https://www.broad.mit.edu/annotation>).

3.1. *Fusarium oxysporum*

3.1.1. Biología

F. oxysporum se describe como un patógeno de plantas, dentro del cual se encuentran especies con hifas hialinas y septadas, y sin ciclo sexual conocido. Se ha descrito que es capaz de parasitar más de 120 cultivos diferentes, incluyendo cultivos de flores, algodón o palmeras. Cada aislado de *F. oxysporum* produce marchitez vascular en una especie vegetal determinada, de manera que de acuerdo con la especificidad del huésped, cada aislado ha sido clasificado en diferentes *formae speciales* (Armstrong y Armstrong, 1981). Como ejemplo, la *forma specialis lycopersici*, objeto de estudio de este trabajo, es patógena en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). El estudio de las relaciones filogenéticas entre aislados ha demostrado que la capacidad de patogenizar una especie vegetal ha surgido independientemente varias veces a lo largo de la evolución de *Fusarium* (Baayen *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998). La considerable variación genética observada en este hongo con reproducción asexual se atribuye a mecanismos alternativos como transposones (Daboussi y Capy, 2003) o la formación de heterocariontes (Teunissen *et al.*, 2002).

F. oxysporum forma un micelio de textura algodonosa y color blanco que puede cambiar a una amplia variedad de colores – desde rosa pálido hasta púrpura oscuro –, según el aislado y las condiciones ambientales. Estas pueden afectar también a la velocidad de crecimiento, a la forma, tamaño y abundancia de sus esporas, y al número de septos de sus hifas (Booth, 1971). Las esporas de *F. oxysporum* pueden ser de tres tipos (Figura 1). Las macroconidas representan las esporas típicas del género a pesar de ser las menos abundantes. Son septadas (de 3 a 5 células), puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las microconidias, con una o dos células, son

las que se producen con mayor abundancia y frecuencia, y presentan formas ovaladas y cilíndricas. Las clamidosporas, también de una o dos células, presentan una forma esférica, tienen una pared engrosada y son las más resistentes (Agrios, 1997).



Figura 1. Tipos de esporas producidas por *Fusarium*. **A**, macroconidias, puntiagudas y septadas; **B**, microconidias, producidas con mayor abundancia y frecuencia; **C**, clamidosporas, de forma esférica, las más resistentes.

3.1.2. Ciclo de vida

F. oxysporum es un patógeno típico de suelo, en el que puede permanecer largos períodos de tiempo 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 saprofítico) (Beckman, 1987) (Figura 2).

Las plantas sanas suelen infectarse con el hongo si el suelo en el que se encuentran está contaminado. Cuando el hongo percibe la proximidad de las raíces de la planta, induce la germinación de las esporas y la penetración de las mismas (estado parasítico). Este hongo puede además vivir en la parte más externa de raíces de plantas no hospedadoras. Una vez en el interior de una planta hospedadora, el hongo crece intra e intercelularmente atravesando la epidermis y el córtex radicular, hasta llegar a los vasos del xilema, por el que coloniza las partes más altas de la planta y provoca la enfermedad (estado patogénico).

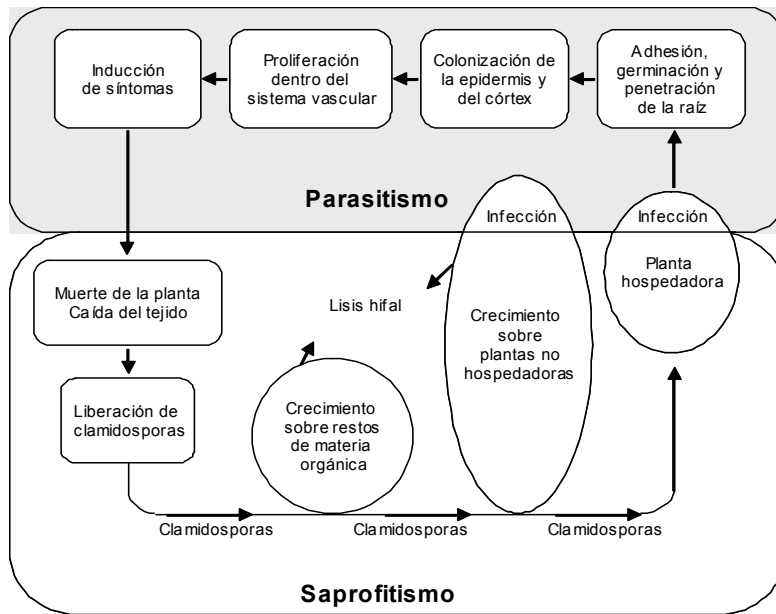


Figura 2. Ciclo de vida de *F. oxysporum* (Beckman, 1987).

3.1.3. El proceso de infección

Es bien conocido que los patógenos de suelo, incluido *F. oxysporum*, son capaces de detectar la presencia de una planta hospedadora antes de establecer un contacto físico, probablemente debido a los compuestos presentes en los exudados de la raíz. Por tanto, estos hongos deben tener mecanismos de señalización para detectar la presencia de estos compuestos en el medio y responder adecuadamente mediante la activación de los genes apropiados. En *Fusarium* se conocen dos rutas de transducción de estas señales que regulan el desarrollo y la virulencia del hongo: la cascada de la adenosina monofosfato - proteína kinasa A (AMPC-PKA) y la ruta de la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) (Di Pietro *et al*, 2003).

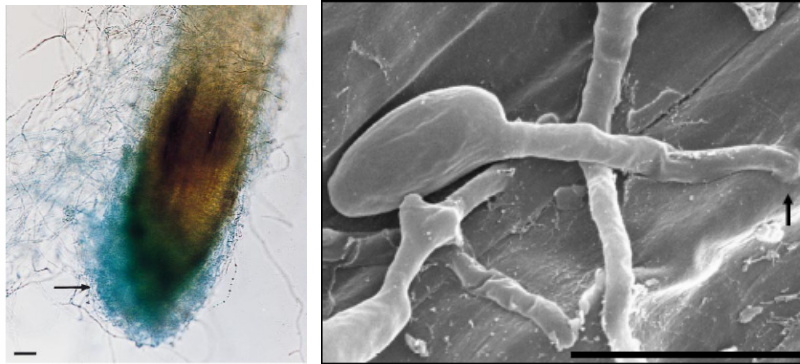


Figura 3. (a) Hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizando las células de la raíz (flecha), después de 48 horas de la inoculación. Barra, 40 μm (Olivain y Alabouvette, 1999). (b) Detalle de la adhesión y penetración de una espora de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en células de raíz. Barra, 8 μm (Martín-Urdíroz, Tesis doctoral).

Tras la detección de la planta y la activación de las rutas de transducción, comienza el ciclo infeccioso de *F. oxysporum*. Después de la adhesión de las esporas a la superficie de la raíz, se forma una densa red de hifas, visible pocas horas después de la inoculación y que parece necesaria para iniciar la penetración (Figura 3) (Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995; Olivain y Alabouvette, 1999; Czymmek *et al.*, 2007).

El estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) de cortes ultrafinos de raíces infectadas con *Fusarium* ha demostrado que este hongo no desarrolla apresorios ni hifas especiales de penetración (Figura 3) (Olivain y Alabouvette, 1999). Cuando las hifas penetran la pared externa de las células epidérmicas, se estrechan y forman un septo en el punto de penetración. La rápida penetración fúngica de la raíz conduce a una pérdida de turgor de las células vegetales y una retracción de las mismas a medida que el hongo avanza hacia el córtex (Figura 4).

En ese momento, las células vegetales ponen en marcha diferentes reacciones para detener la invasión fúngica, que incluyen la formación de agregados y protuberancias en el citoplasma para atrapar al patógeno, así como la acumulación de sustancias tóxicas para el hongo y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

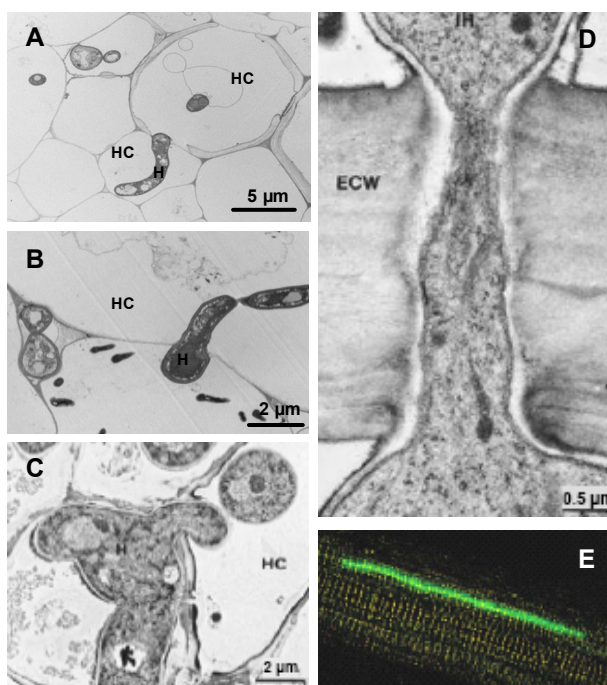


Figura 4. Mecanismo de infección de *F. oxysporum*. **(a-c)** Crecimiento inter e intracelular del hongo en las células parenquimáticas de la planta, dos días después de la infección (H = célula hifal; HC = célula del hospedador) (Martín-Urdíroz, Tesis doctoral, 2008; Wanjiru *et al.*, 2002). **(d)** Penetración de una hifa infectiva de *Fusarium* a través de la pared celular epidérmica vegetal (ECW = pared celular epidérmica; IH = hifa de infección). **(e)** Hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* portador del gen *gfp* en el interior de los vasos del xilema de tomate (Di Pietro *et al.*, 2001a).

Por su parte, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil del interior de la planta, poniendo en marcha su maquinaria de ataque, que consiste en la expresión de enzimas que degradan la pared celular vegetal (poligalacturanasas, pectinasas, xilanasas y proteasas) (Di Pietro *et al.*, 2009), la expresión de enzimas que degradan los compuestos tóxicos de las plantas (tomatinasas, lacasas) (Roldán-Arjona *et al.*, 1999; Cañero y Roncero, 2008a) y el refuerzo de su propia pared celular para resistir los daños causados por estas sustancias tóxicas. Si el hongo logra superar estas defensas, invade el córtex creciendo por los espacios inter e intracelulares hasta llegar al sistema vascular, en el que crece en sentido ascendente hacia las partes aéreas de la planta. Dentro del xilema, *Fusarium* se ramifica y produce esporas que son transportadas por la savia a otras partes de la planta, donde pueden también germinar y volver a esporular. La obstrucción

de los vasos conductores consecuencia de la formación de micelio y del desarrollo de estructuras de defensa de la planta para detener el patógeno, origina un desequilibrio hídrico. Las hojas cierran sus estomas, comienzan a amarillear y finalmente se marchitan, junto con el tallo y el resto de la planta. En ese momento, el hongo coloniza la planta moribunda y crece vigorosamente como saprófito, produciendo gran cantidad de biomasa fúngica y clamidosporas, que caerán al suelo y esperarán la aparición de un nuevo hospedador para empezar su ciclo infeccioso (Beckman, 1987).

3.1.4. Genes esenciales para la patogénesis

En *F. oxysporum* se han empleado fundamentalmente dos aproximaciones experimentales para la identificación de genes esenciales en patogénesis (Di Pietro *et al.* 2003). La primera ha consistido en la anulación dirigida de genes que codifican proteínas implicadas en funciones biológicas conocidas y que presumiblemente podrían resultar relevantes durante el proceso de infección. Alternativamente se han aislado mutantes no patógenos mediante la inserción al azar de fragmentos de ADN (transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot *et al.*, 1998) e integración de elementos móviles (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001; Lopez-Berges *et al.*, 2009)) y la subsiguiente identificación del gen interrumpido (Madrid *et al.*, 2003). No obstante la anulación dirigida de genes ha sido el método que ha generado mayor información.

Hasta el momento se han aislado mutantes en genes de potencial interés para la patogénesis de *Fusarium*, que participan en diversos procesos necesarios para la infección de la planta, como la transducción de señales activada tras la detección del hospedador, la degradación enzimática de la pared celular vegetal o la superación de las defensas de las plantas (Tabla 1) (Di Pietro *et al.* 2003; Michielse y Rep, 2009). Muchos de los genes identificados 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 1. Genes de *F. oxysporum* estudiados mediante interrupción dirigida

| Proceso | Gen | Función | Efecto en patogénesis | Referencia |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Señalización | <i>fga1</i> | Subunidad α de proteína G | Virulencia muy reducida | Jain <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>fga2</i> | Subunidad α de proteína G | No patógeno | Jain <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>fgb1</i> | Subunidad β de proteína G | Virulencia muy reducida | Jain <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>fmk1</i> | MAP Kinasa | No patógeno | Di Pietro <i>et al.</i> , 2001a |
| Biogénesis e integridad de la pared celular fúngica | <i>chs1</i> | Síntesis de quitina | Ninguno | Martín-Urdiroz <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>chs2</i> | Síntesis de quitina | Virulencia reducida | Martín-Urdiroz <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>chs7</i> | Similar a chaperona | Virulencia reducida | Martín-Urdiroz <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>chsV</i> | Síntesis de quitina | No patógeno | Madrid <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>chsVb</i> | Síntesis de quitina | No patógeno | Martín-Urdiroz <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>gas1</i> | glucanosiltransferasa | Virulencia muy reducida | Caracuel <i>et al.</i> 2005 |
| | <i>rho1</i> | Proteína G monomérica | Virulencia muy reducida | Martinez-Rocha <i>et al.</i> , 2008 |
| Degradación de la pared celular vegetal | <i>ctf1</i> | Factor de transcripción | Ninguno | Rocha <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>fcd1</i> | oxidoreductasa | Ninguno | Kawabe <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>fnr1</i> | Factor de transcripción | Virulencia muy reducida | Divon <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>frp1</i> | Proteína F-box | No patógeno | Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>lcl1</i> | Isocitrato liasa | Ninguno | Jonkers <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>pg1</i> | poligalacturonasa | Ninguno | Di Pietro <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>pg5</i> | poligalacturonasa | Ninguno | García-Maceira <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>pgx4</i> | poligalacturonasa | Ninguno | García-Maceira <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>pl1</i> | Pectato liasa | Ninguno | Huertas-Gonzalez <i>et al.</i> , 1999 |
| | <i>prt1</i> | Serin proteasa | Ninguno | Di Pietro <i>et al.</i> , 2001b |
| | <i>snf1</i> | Proteína quinasa | Virulencia muy reducida | Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>xlnR</i> | Factor de transcripción | Ninguno | Calero-Nieto <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>xy13</i> | Xilanasa | Ninguno | Gomez-Gomez <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>xy14</i> | Xilanasa | Ninguno | Gomez-Gomez <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>xy15</i> | Xilanasa | Ninguno | Gomez-Gomez <i>et al.</i> , 2001 | |
| Superación de la defensa vegetal /Adaptación al interior de la planta | <i>clc1</i> | Canal de cloro | Virulencia reducida | Cañero y Roncero, 2008b |
| | <i>cmle1</i> | Carboxy-cis, cis-muconato ciclasa | No patógeno | Reijnen <i>et al.</i> , no publicado |
| | <i>lcc1</i> | Lacasa | Ninguno | Cañero y Roncero, 2008a |
| | <i>lcc3</i> | Lacasa | Ninguno | Cañero y Roncero, 2008a |
| | <i>lcc5</i> | Lacasa | Ninguno | Cañero y Roncero, 2008a |
| | <i>pacC</i> | Factor de transcripción | Muy virulento | Caracuel <i>et al.</i> , 2003 |

Tabla 1. Continuación.

| Proceso | Gen | Función | Efecto en patogénesis | Referencia |
|---------|--------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| | <i>arg1</i> | Argininosuccinato liasa | Virulencia muy reducida | Namiki <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>cti6</i> | Factor de transcripción | Virulencia reducida | Michielse <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>dcw1</i> | Proteína de pared | Virulencia reducida | Michielse <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>fow1</i> | Transportador mitocondrial | Virulencia muy reducida | Inoue <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>fow2</i> | Factor de transcripción | No patógeno | Imazaki <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>fpd1</i> | Proteína reguladora | Virulencia muy reducida | Kawabe <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>fso1</i> | Proteína de fusión vegetativa | Ninguno | Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2008 |
| Otros | <i>ftf1</i> | Factor de transcripción | Virulencia reducida | Ramos <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>pex12</i> | peroxina | Virulencia reducida | Michielse <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>pex26</i> | Peroxina | Virulencia reducida | Michielse <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>ren1</i> | Factor de transcripción | Ninguno | Ohara <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>sge1</i> | Factor de transcripción | No patógeno | Michielse <i>et al.</i> , no publicado |
| | <i>six1</i> | Proteína de secreción | Virulencia reducida | Rep <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>sti35</i> | Biosíntesis de tiamina | Ninguno | Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>stuA</i> | Factor de transcripción | Ninguno | Ohara y Tsuge, 2004 |
| | <i>wc1</i> | Fotorreceptor | Ninguno | Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2008 |

Sin embargo, todavía se desconoce el papel que pueden desempeñar muchos genes en el proceso de patogénesis. Este es el caso del gen *tom1* (Lairini *et al.*, 1996) de *F. oxysporum*, responsable de una enzima que detoxifica la fitoanticipina α -tomatina, una sustancia tóxica antifúngica producida por las plantas de tomate. Aunque la enzima ha sido muy bien caracterizada (Roldán-Arjona *et al.*, 1999), hasta el momento no se había determinado su función durante la patogénesis del hongo.

También resulta interesante que la interrupción dirigida de algunos genes relacionados con la síntesis de pared celular fúngica ha originado mutantes no patógenos. Los mutantes en los genes sintasas de quitina con motor miosina, *chsV* y *chsVb*, resultaron ser más sensibles a compuestos

tóxicos producidos por las plantas, como el H₂O₂ o la α-tomatina (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008). Además estos mutantes, al tener la pared celular alterada, podrían generar mayor cantidad de compuestos elicitors que alertaran a la planta de la presencia del hongo.

3.1.5. Control de la fusariosis

El control de esta enfermedad se realiza principalmente mediante fumigación del suelo con agentes químicos y mediante el empleo de variedades de plantas resistentes. Ambos métodos de control resultan problemáticos: el primero debido a que muchos agentes antimicrobianos usados tienen un amplio espectro de acción, ocasionan graves daños en el medio ambiente y originan la aparición de cepas resistentes; y el segundo debido al elevado coste económico que supone la obtención de cultivares resistentes a *Fusarium*. Por otro lado, la sociedad actual demanda cada vez más alimentos libres de residuos químicos y está más concienciada de la necesidad de preservar el medio ambiente. Por todo esto, se están también empleando métodos alternativos de control que incluyen la solarización del suelo o el uso de agentes de biocontrol, como cepas de microorganismos antagonistas o aislados de *Fusarium* no patógenos (Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2006).

Todo ello hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias de control de la enfermedad, lo que requiere un conocimiento preciso de las bases moleculares del proceso de patogénesis que permita encontrar nuevas dianas para diseñar antibióticos con acción dirigida, o compuestos y agentes que controlen de forma ecológica estas plagas.

Objetivos

El objetivo general de la tesis ha sido investigar las bases moleculares que determinan la patogenicidad del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate, estudiando particularmente la relación entre la morfología del patógeno y el desarrollo de la enfermedad, y la importancia de la detoxificación de compuestos antifúngicos producidos por las plantas de tomate. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1.- Interrupción dirigida por reemplazamiento génico y sobreexpresión del gen tomatinasa. Caracterización bioquímica y patotípica de los mutantes obtenidos.

2.- Estudio de las bases moleculares de la avirulencia del mutante deficiente en la síntesis de quitina $\Delta chsV$, así como su interacción con la estirpe silvestre durante la infección de plantas de tomate.

3.- Aislamiento y caracterización molecular del gen *con7* en *Fusarium oxysporum*, ortólogo a *con7* de *Magnaporthe grisea*, que determina un factor de transcripción implicado en patogénesis y morfogénesis. Interrupción dirigida del mismo y caracterización fisiológica y patotípica de los mutantes obtenidos. Estudio de su función en la regulación de otros genes estructurales implicados en la biogénesis de pared celular fúngica.

Material
y
Métodos

1. Materiales

1.1. Material biológico

Las estirpes bacterianas y fúngicas, y los cultivares de plantas utilizados en este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Material biológico empleado (¹Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería; ²Dpto. Genética, Universidad de Córdoba; ³Syngenta Seeds, Almería).

| Especie | Estirpe/Cultivar | Características |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | XL1-Blue | <i>supE44 lac[F' proAB lacIqΔM15 Tn10 (Tetr)] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> Receptora en los experimentos de transformación genética y para la obtención de DNA copia |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 4287 <i>Δtom1</i> <i>tom1^C</i> <i>ΔchsV</i> <i>Δfmk</i> <i>Δgas</i> FoH1::ChFP <i>Δcon71</i> <i>Δcon72 Δcon73</i> | Estirpe silvestre (f. sp. <i>lycopersici</i> , raza 2) (Dr. J. Tello ¹) gen <i>tom1</i> anulado (esta Tesis) gen <i>tom1</i> con expresión constitutiva (esta Tesis) gen <i>chsV</i> anulado (Madrid <i>et al.</i> , 2003) gen <i>fmk</i> anulado (Di Pietro <i>et al.</i> , 2001a) gen <i>gas</i> anulado (Caracuel <i>et al.</i> , 2005) histona H1 marcada con la proteína roja fluorescente mediante fusión traduccional (Dra. C. Ruiz-Roldán ²) gen <i>con7</i> anulado (esta Tesis) genes <i>con72</i> y <i>con73</i> anulados (esta Tesis) |
| Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) | Daniella Liso Monika ³ | Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |
| Manzana (<i>Malus pumila</i> Mill.) | Golden | Sensible a la raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |

1.2. Medios

Los medios se esterilizaron en el autoclave a 120 °C durante 20 minutos o mediante filtración (Millipore con diámetro de poro de 0.22 µm).

1.2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

A. Medio Luria-Bertani

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

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

B. Medio sulfato-maltosa (SM)

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

C. Medio LA-XGal-Ampicilina-IPTG

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

1.2.2. Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*

El pH del medio es ajustado a 8 con NaOH cuando contenga fleomicina y a 6.3 cuando contenga Calcoflúor White (CFW).

A. Medio nutritivo

Líquido (PDB): Hervir 200 g de patatas peladas y troceadas en 1 l de agua durante 60 minutos. Filtrar, añadir 20 g de glucosa, enrasar hasta 1 l y esterilizar en el autoclave.

Sólido (PDA): 3.9% agar de patata y dextrosa (p/v) (Scharlau Microbiology).

Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 mg/ml en PDB y 55 mg/ml en PDA) o fleomicina (1.6 µg/ml en PDB y 4 µg/ml en PDA).

B. Medio sintético de ARNE (SM)

Líquido: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g/l), KH_2PO_4 (0.4 g/l), KCl (0.2 g/l), NH_4NO_2 (1g/l), $FeSO_4$ (0.01 g/l), $ZnSO_4$ (0.01 g/l), $MnSO_4$ (0.01 g/l) y glucosa (10 g/l).

Sólido: Medio líquido suplementado con 15 g/l de bactoagar.

C. Medio mínimo de regeneración

Líquido: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), KCl (0.5 g/l), $NaNO_3$ (2 g/l), glucosa (20 g/l) y sacarosa (200 g/l).

Sólido: Medio líquido suplementado con agar (Oxoid) a 12.5 g/l para medio sólido ó a 4 g/l para agar de cobertera.

D. Medio de casaminoácidos (CA)

Medio líquido: Casaminoácidos (10 g/l); 10 mM sulfato amónico; yeast nitrogen base (0.5 g/l).

Medio sólido: medio líquido suplementado con 20 g/l de agar. El pH del medio se ajustó a 7 con NaOH.

1.3. Compuestos químicos

Para estudiar el efecto de los compuestos 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolifosfato (BCIP) (Sigma), Menadiona (Sigma), Cafeína (Sigma), α -tomatina (Extrasynthese), Congo Red (Sigma), Sodium dodecil sulfato (SDS) (Fluka) y Calcofluor White (CFW) (Sigma), y sobre el crecimiento del hongo y realizar tinciones con CFW se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 3. Compuestos químicos utilizados

| Compuesto | Concentración de almacenamiento | Conservación |
|--------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| BCIP | 50 mg/ml en dimetilformamida | -20°C (oscuridad) |
| Menadiona | 4 mg/ml en etanol | -20°C (oscuridad) |
| Cafeína | 150 mM en agua | -20°C (oscuridad) |
| α -tomatina | 15 mg/ml en tampón sodio-acetato 50 mM pH 4.5 | 4°C |
| Congo Red | 50 mg/ml en agua | RT (oscuridad) |
| SDS | 0.1 g/ml en agua | RT |
| CFW | 25 mg/ml en agua pH 6.3 | RT (oscuridad) |

1.4 Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores de las reacciones de amplificación y secuenciación se diseñaron con el programa Oligo, analizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de horquillas y dímeros no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m, T_d, % G+C, % A+T). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por empresas comerciales (MWG-Biotech y Bonsai Technologies).

Tabla 4. Oligonucleótidos generales.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Nombre | Secuencia (5'-3') |
|---------|-----------------------|------------|-------------------------|
| Forward | CGTTGTAAAACGACGGCCAGT | Gpd-2k | CAGCGACTGGTACCTCCA |
| Reverse | GCGGATAACAATTTACACAGG | Hph-12 | TTCGGGGCAGTCCCTCGGC |
| GpdA-16 | AGGGGCTGTATTAGGTCTCG | Hph-6 | TCGTTATGTTTATCGGCACTTT |
| GpdA-6H | AAGCTTCAGTTCATGGGCGTT | Trppter-2k | GATTACCTCTAAACAAGGGTACC |

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

| Gen | Nombre | Secuencia (5'-3') |
|-----------------------------------------------|---------|-------------------------|
| Actina (<i>act</i>) | Act-1 | ATGACCCAGATCGTCTTCGAG |
| Actina (<i>act</i>) | Act-2 | GAGGGACCGCTCGTCGT |
| Actina (<i>act</i>) | Act-2 | GAGGGACCGCTCTCGTCGT |
| Actina (<i>act</i>) | Act-6q | GGAGATCCAGACTGCCGCTCAG |
| Proteína de unión a quitina (<i>cbp2</i>) | Cbp2-3 | TCTTCGCCACAATGCCAAATG |
| Proteína de unión a quitina (<i>cbp2</i>) | Cbp2-4 | TCTTGTCAGGGGTGTTGTTCT |
| Sintasa de quitina clase 1 (<i>chs1</i>) | Chs1-8 | TCGACTTCCTCCGATCTGAT |
| Sintasa de quitina clase 1 (<i>chs1</i>) | Chs1-22 | CCTTGTTCTTGAAGATGTCTG |
| Sintasa de quitina clase 2 (<i>chs2</i>) | Chs2-12 | CCTCCTCCTTCAGATGGCAT |
| Sintasa de quitina clase 2 (<i>chs2</i>) | Chs2-23 | GTGGAGACTCGGGAACCT |
| Sintasa de quitina clase 3 (<i>chs3</i>) | Chs3-12 | GTGTCATGGGGAACAAAGGG |
| Sintasa de quitina clase 3 (<i>chs3</i>) | Chs3-18 | CCTGTAACCCCAAAGTATGT |
| Sintasa de quitina clase 4 (<i>chs4</i>) | Chs4-10 | CAGACAAGAAATACGCAGAATG |
| Sintasa de quitina clase 4 (<i>chs4</i>) | Chs4-3 | GCAGTAACCAAGCACATCGTA |
| Sintasa de quitina clase 6 (<i>chs6</i>) | Chs6-17 | GGAACACAGCGAAGAATGAAG |
| Sintasa de quitina clase 6 (<i>chs6</i>) | Chs6-18 | TGCGGGGTAGATGTGGGCTT |
| Regulador síntesis de quitina (<i>chs8</i>) | Chs8-6 | ACGACGGGAATGTTGCTCTC |
| Regulador síntesis de quitina (<i>chs8</i>) | Chs8-19 | GGCGTACTGTTCTCCTGAC |
| Sintasa de quitina clase 5 (<i>chsV</i>) | ChsV-3 | ACAGCTCCAACGAACTCTCTT |
| Sintasa de quitina clase 5 (<i>chsV</i>) | ChsV-6 | CCGAGTTTCTGGGTATGACA |
| Sintasa de quitina clase 5 (<i>chsV</i>) | ChsV-20 | GCACAATTTGGCTGAGCTTAT |
| Sintasa de quitina clase 5 (<i>chsV</i>) | ChsV-26 | GGAGGTACTIONGGTCATGTCGT |

Tabla 5. Continuación.

| Gen | Nombre | Secuencia (5'-3') |
|---------------------------------------------|--------------|----------------------------|
| Sintasa de quitina clase 5 (<i>chsV</i>) | ChsV-36B | GGATCCCTACAATTGGCCAGAAAGCA |
| Sintasa de quitina clase 7 (<i>chsVb</i>) | chsVb-15 | GCTTCCAGAGACTTGTAGATG |
| Sintasa de quitina clase 7 (<i>chsVb</i>) | chsVb-19 | ACTGTTGATGCTACTCTCGCT |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-7 | TTCTTTATCATCAGCCCCGTG |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-10 | AAGGTCGCATCAGGTCAAAC |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-11B | GAAGGAAGAGGATCCCAACCGAAA |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-12B | TTTCGGTTGGGATCCTCTTCCTTC |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-14B | ACATGCGCTGGATCCCCTCGTATC |
| Factor de transcripción (<i>con7-1</i>) | Con71-13B | GATACGAGGGGATCCAGCGCATGT |
| Factor de transcripción (<i>con7-2</i>) | Con72-1 | TAGGCTACTCTCCCAATGTGA |
| Factor de transcripción (<i>con7-2</i>) | Con72-6B | CGTTCAAGTGGATCCGTGTGCCGT |
| Factor de transcripción (<i>con7-2</i>) | Con72-5B | ACGGCACACGGATCCACTTGAACG |
| Factor de transcripción (<i>con7-2</i>) | Con72-4 | AACGATGGTGAGAAGGGGAAA |
| Factor de transcripción (<i>con7-2</i>) | Con72-3 | CCGTCTCAAGAACTACAACCA |
| Glucano sintasa (<i>fks</i>) | Fks-5 | TTTGAAGAGATGAAGACTGACA |
| Glucano sintasa (<i>fks</i>) | Fks-6 | GAGGGCATTATACCAGCGT |
| Chitinasa 18-3 | FOXG_00921-F | TTAGTGATGAGTGGGCGGATG |
| Chitinasa 18-3 | FOXG_00921-R | TGGTAGATGAATGCGGACAGC |
| S-formilglutathion hidrolasa | FOXG_02259-F | CCAATGAGCTTCCCGACCTC |
| S-formilglutathion hidrolasa | FOXG_02259-R | CTGGTAGCGGAGAGTCAAGC |
| β -glucosidasa | FOXG_02657-F | AATACCTCTGGGCAATCGAACT |
| β -glucosidasa | FOXG_02657-R | GTCATCGCGGTAGCATTAGA |
| α -L-ramnosidasa | FOXG_04665-F | TCTGGCATGATGTGGTCGTCT |
| α -L-ramnosidasa | FOXG_04665-R | GAGTATGCGGTCTGCGTGTC |
| β -glucosidasa | FOXG_06568-F | GAGTATGCGGTCTGCGTGTC |
| β -glucosidasa | FOXG_06568-R | GCCCAGAAGAATCCAGTCAAC |
| Tioesterasa | FOXG_07014-F | GCCTTCAAACATGGTCGAAAGT |
| Tioesterasa | FOXG_07014-R | GCGAAAGCCAACTTGTAGGAG |
| Tioesterasa | FOXG_07432-F | CTCCTCGGGCGGTACAAAG |
| Tioesterasa | FOXG_07432-R | TCATGGATAGACCGTCGTTGG |
| Exo-poligalacturonasa (<i>pgx4</i>) | FOXG_08862-F | GTACAGCATTGCCTCGCCAC |
| Exo-poligalacturonasa (<i>pgx4</i>) | FOXG_08862-R | CGGGTTTCTCATTGCGAGGTT |
| β -1,3-glucanasa | FOXG_09503-F | TCTGCGAGGGCTTGAAGCGT |
| β -1,3-glucanasa | FOXG_09503-R | CCCATTCTGCCTGCGTGTTG |
| β -1,3-glucanasa | FOXG_12407-F | GATCAGCTTCTCTGCGAGGG |
| β -1,3-glucanasa | FOXG_12407-R | TGTCTCATCTTAATACCGTGTAC |
| Endo-poligalacturonasa | FOXG_12535-F | CTGGAAAGACTCTGGACCTGA |
| Endo-poligalacturonasa | FOXG_12535-R | TGTGTCCGCCAGTTTGTCTG |
| Endo-poligalacturonasa (<i>pg5</i>) | FOXG_13051-F | GCCTGGTCGCCCTCCGTA |
| Endo-poligalacturonasa (<i>pg5</i>) | FOXG_13051-R | TCTTCTTGCCGCCGTTGCTG |

Tabla 5. Continuación.

| Gen | Nombre | Secuencia (5'-3') |
|----------------------------------------------------|--------------|------------------------------|
| Chitinasa 18-3 | FOXG_14329-F | AGCCCAACGAGCCGTCAAGT |
| Chitinasa 18-3 | FOXG_14329-R | AACTGCCGCCAGCGTATGAG |
| α -1,6-manosidasa | FOXG_14366-F | CGTCTGGAATAAGGTTGTCAAG |
| α -1,6-manosidasa | FOXG_14366-R | CCCGCTTTTTCTGCTATTGTGA |
| Sacarosa-6-fosfato-hidrolasa | FOXG_14383-F | GGCTCCTCCGCTTGCTCCT |
| Sacarosa-6-fosfato-hidrolasa | FOXG_14383-R | TGCTGCCATCTTTGCTAGTCG |
| Inulinasa | FOXG_14385-F | GAGCAAGAGAAACCGCACGAT |
| Inulinasa | FOXG_14385-R | ATCACGCCCAAAGTCGAGCC |
| Endo-poligalacturonasa <i>pg1</i> | FOXG_14695-F | GCAGCGTCACTGACTACTCC |
| Endo-poligalacturonasa <i>pg1</i> | FOXG_14695-R | GTTAGAACCTTCGCCATCCCA |
| Endoglucanasa | FOXG_14951-F | GCTGGCTCGTTTCAGATCCCT |
| Endoglucanasa | FOXG_14951-R | CGGGAGCAGCAGCGGAGAT |
| Proteína de unión a quitina | FOXG_15172-F | GACGCACGCAAGAACGCCTA |
| Proteína de unión a quitina | FOXG_15172-R | ACGCTGTGACACCGCATGGA |
| α -L-ramnosidasa | FOXG_15491-F | CGATTTGGCATGATGTGGTTGT |
| α -L-ramnosidasa | FOXG_15491-R | GCCTCTTGGTGACACGTATTC |
| Acetil xilano esterasa | FOXG_16779-F | GCCCAGCAGCAGTTTACATCT |
| Acetil xilano esterasa | FOXG_16779-R | TGTCCGAGAGCCTAGATAGA |
| β -1,3-glucanosiltransferasa (<i>gas1</i>) | Gas-1 | GACTCCGACCTCTGCGACT |
| β -1,3-glucanosiltransferasa (<i>gas1</i>) | Gas-5 | TCCGAGGCGTAACCGACACC |
| Componente del polarisoma (<i>spa</i>) | Spa-1 | AATGGTAATGGCTTTCCCCCT |
| Componente del polarisoma (<i>spa</i>) | Spa-2 | TTCTCCTGGTTGGTAGTAGCA |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-X1 | TCTAGAATGAAGGCCACTATCATCATCG |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-3 | CTTGGCACTGGAATGAAAGTC |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-5B | TGGGTTACAGGATCCTGAGATAAG |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-8 | GCTGACCCAGACAGGCTGC |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-9B | ACTGAGAGAGGATCCGGCCAAGAA |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-10B | TTCTTGGCCGGATCCTCTCTCAGT |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-11X | CTCGAGCTCAAGCAGTCAAATCCCCT |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-12H | AAGCTTCGACGAGTTGTGCTACCATCT |
| Tomatinasa 1 (<i>tom1</i>) | Tom1-16 | AACATCAAGGGCTTCGCTCC |
| Tomatinasa 2 (<i>tom2</i>) | Tom2-1 | CCACTTCTGCGACACTGCTA |
| Tomatinasa 2 (<i>tom2</i>) | Tom2-2 | CTGTGTTTCCTGTTTCGTTTCC |
| Tomatinasa 3 (<i>tom3</i>) | Tom3-1 | CTATCATTGGTCTTGCCCGTT |
| Tomatinasa 3 (<i>tom3</i>) | Tom3-2 | TGTTGGAGGATACTGCGTCTA |
| Tomatinasa 4 (<i>tom4</i>) | Tom4-1 | ATCCCCGTCTATCCCTCCC |
| Tomatinasa 4 (<i>tom4</i>) | Tom4-2 | AAGAGACTCCAGAATGCGTTG |
| Tomatinasa 5 (<i>tom5</i>) | Tom5-1 | TGTGTTGGTCTCGGGTCTTTT |
| Tomatinasa 5 (<i>tom5</i>) | Tom5-2 | TAGTCTCCTCCATCGCAATAC |

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos de genes de planta.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Nombre | Secuencia (5'-3') |
|---------|------------------------|--------|-------------------------|
| Chi3-F | TCTTGTCTCTTTTTCTTGTTCC | gluA-R | TGAGACCTTGATTTGATTTTGC |
| Chi3-R | GCAGTATCATCACCAGCAGT | gluB-F | ATTCTGTTTATGCTGCGATGG |
| Chi9-F | GCCTTCTTGTACAGATGTCA | gluB-R | CTTTCTCGGACTACCTTCTTT |
| Chi9-R | CTCCAAGAATTCGCAATACC | Lin6-F | GAAACACTAAGAAAGAAAAAGGT |
| Gapdh-F | TGATGTTGAACTCGTCGCAG | Lin6-R | AGACCACCTTGAACCGTTGA |
| Gapdh-R | CCAAAAACAGTAACAGCCTTC | Pr1-F | GCATCCCAGACACAAAATA |
| gluA-F | CCAATCCTTCCAACGCCAA | Pr1-R | TGGTAGCGTAGTTATAGTCTG |

1.5. Vectores de clonación

Los vectores de clonación utilizados se detallan a continuación:

Tabla 7. Vectores utilizados en este trabajo.

| Plásmido | Características | Referencia |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| pGem®-T | Derivado de pGem®-5Zf(+), linealizado con la enzima <i>EcoRV</i> y con una T en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con Adenina en sus extremos. | Promega |
| pAN7-1 | Contiene el gen <i>hph</i> bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> y el terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> | Punt <i>et al.</i> , 1987 |
| pAN8-1 | Promotor del gen <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> ; gen de resistencia a fleomicina y terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> clonados en pUC18 <i>Eco RI-Sall</i> . | Mattern <i>et al.</i> , 1988 |

1.6. Programas para el análisis de datos

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

Tabla 8. Programas para el análisis de datos.

| Programa | Aplicación |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BLAST (NCBI) | <p>Blastn (estándar) Búsqueda de secuencias nucleotídicas similares a la problema</p> <p>Blastp (estándar de proteína) Búsqueda de proteínas similares a la proteína en estudio</p> <p>Blastx (traducido) Búsqueda de secuencias de proteínas similares a la traducción de la secuencia nucleotídica en estudio</p> |

Tabla 8. Continuación

| Programa | Aplicación | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| tBlastx (traducido) | Búsqueda de proteínas, deducidas de traducciones de secuencias nucleotídicas, similares a la traducción de la secuencia nucleotídica problema | |
| Lasergene (DNA-Star) | EditSeq MapDraw MegAlign SeqMan | Edición de secuencias Análisis de la ORF y de sitios de enzimas de restricción Alineamiento de secuencias con homología Gestión de contigs y ensamblaje de secuencias de ADN |
| Oligo (Mol. Biology Insights Inc., EE.UU.) | Selección de oligonucleótidos en una secuencia problema con las características deseadas | |
| PredictProtein (http://www.predictprotein.org) | Predicción de dominios y sitios de modificación post-traducional de proteínas | |
| BioEdit | Edición de alineamientos de secuencias | |
| Modelgenerator v84 (Keane <i>et al.</i> , 2006) | Optimización de los parámetros empleados en la construcción de árboles filogenéticos | |
| Phyml v2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003) | Análisis del alineamiento resultante de secuencias, para la elaboración de árboles filogenéticos | |
| TreeView v1.6.6 (Page, 1996) | Construcción de árboles filogenéticos | |
| KODAK 1D Image Análisis | Captura, ajuste y análisis de imágenes obtenidas de geles de ADN y ARN | |
| Leica IM 500 y Leica Qwin | Edición y análisis de imágenes obtenidas con el microscopio óptico y lupa Leica | |
| FUJIFILM Intelligent Dark Box LAS-3000 | Captura, ajuste y análisis de imágenes obtenidas por revelado mediante detección quimioluminiscente | |
| Chromas 2.11 Technelysium | Análisis de cromatogramas | |
| SPSS 15.0 para Windows | Análisis estadístico | |

2. Métodos

2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos

2.1.1. Bacterias

Escherichia coli se cultivó a 37 °C, con agitación (250 rpm) si se trata de medio líquido LB, y en estufas si eran placas de medio sólido.

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

2.1.2. *Fusarium oxysporum*

Los cultivos de hongos se incubaron a 28 °C. Si el medio era líquido, la incubación se realizó con agitación orbital (170 rpm).

Para la conservación de las distintas estirpes, se recogieron las esporas de un cultivo de 3-4 días en medio PDB. Para ello, el cultivo se filtró a través de un filtro de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) para eliminar el micelio, y el filtrado se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. A continuación se lavó el precipitado de esporas con agua destilada estéril y se almacenó a -80 °C con 30% glicerol (v/v). Esta suspensión se utilizó como inóculo para la obtención de las esporas frescas en posteriores ensayos.

2.1.3. Plantas

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en 20% lejía (v/v) durante 30 minutos seguidos de 3 lavados con abundante agua durante 10 minutos cada vez. Una vez sembradas en vermiculita humedecida, se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a una temperatura de 28 °C. Los ensayos de infección se realizaron con plantas de 2-3 semanas, cuando ya habían aparecido las primeras hojas verdaderas.

2.2. Aislamiento de ácidos nucleicos

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

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson (1980), con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia aislada de la estirpe portadora del plásmido de interés en 5 ml de medio selectivo. Después de 12-14 horas de incubación, se centrifugaron 3 ml del cultivo durante 3 minutos a 13000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, la muestra de células se resuspendió en 200 μ l de solución STET⁽¹⁾. A continuación, se añadieron 4 μ l de lisozima (50 mg/ml) para provocar la lisis celular y 2 μ l de ribonucleasa A (RNasa) (10 mg/ml) para eliminar el ARN contaminante, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, la muestra se calentó a 100 °C durante 45 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. Los restos celulares, que quedaron en el fondo del tubo con aspecto mucoso, se retiraron con un palillo de dientes esterilizado. Se añadieron 10 μ l de CTAB⁽²⁾ al sobrenadante para precipitar el ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 μ l de una solución 1.2 M NaCl y 750 μ l de 100% etanol frío. Se homogenizó y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 20 μ 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).

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

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

2.2.2. Extracción de ADN de *F. oxysporum*

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

Se siguió el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con modificaciones. Con ayuda de un mortero, se pulverizaron unos 100 mg de micelio en nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de tampón de extracción CTAB⁽¹⁾. Se homogenizó vigorosamente, se añadieron 4 μl de β -mercaptoetanol (Merck) y 500 μl de una solución cloroformo:octanol (24:1, v/v), y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Al sobrenadante se le añadió 1 ml de 100% etanol frío y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Después se centrifugó durante 5 minutos a 7500 g, se lavó sucesivamente con 1 ml de una solución 200 mM de acetato sódico en 75% etanol (v/v) y 1 ml de una solución 10 mM de acetato sódico en 75% etanol (v/v). Finalmente, se resuspendió en 75 μl de agua desionizada estéril, se añadieron 4 μl de RNasa (10 mg/ml) y se continuó el tratamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

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

1. 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 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ajustar a pH 8.0 con NaOH. Llevar a 100 ml y almacenar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar que precipite.

2.2.3. Extracción de ADN de plantas infectadas

La purificación de ADN a partir de tallos de plantas infectadas se llevó a cabo usando el kit comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 100 mg de tallos se pulverizaron en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y se lisaron en un

tampón que contenía ARNasa para digerir el ARN de la muestra. Tras la lisis, las proteínas y demás restos celulares se eliminaron mediante filtración en columna de lavado. Posteriormente, al lisado se le añadió tampón de adhesión y etanol para permitir la unión del ADN a una nueva membrana del kit. Tras varios lavados, el ADN puro se eluyó en un volumen de 75 µl de agua desionizada estéril.

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

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

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas para cada experimento. Para obtener dicho micelio, las esporas frescas obtenidas de cultivos de 3-4 días en medio PDB, se reinocularon 1.25×10^8 microconidias en 25 ml del mismo medio y se incubaron a 28 °C durante 12 horas con 170 rpm de agitación. Pasado este tiempo, se recogieron las germínulas por filtración a través de filtro de nailon, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. A continuación, se inocularon 250 µl en matraces con 25 ml del medio de interés para el estudio de la expresión génica. Transcurrido el tiempo adecuado, se recogió el micelio utilizando un filtro de nailon, se secó con papel de filtro y se almacenó rápidamente a -80 °C hasta su utilización.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron 100 mg de micelio en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero, y se transfirieron a un vial de 2 ml que contenía 1 ml de *Tripure Isolation Reagent* (Roche). Se homogenizó vigorosamente y se centrifugó a 4 °C, durante 10 minutos y 12000 g. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 0 °C durante 5 minutos, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µl de cloroformo y se homogenizó vigorosamente durante 15 segundos. Posteriormente, se incubó a 0 °C durante 15 minutos. Después de centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 12000 g, la solución se separó en tres fases. La fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un vial limpio, al que se le añadieron 500 µl de

isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a 0 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos y 12000 g, para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de 75% etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos y a 7500 g, se secó, se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNasas y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 minutos.

Cada muestra de ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 1% agarosa (p/v).

2.2.5. Extracción de ARN a partir de raíces de plantas infectadas

La purificación de ARN a partir de raíces de plantas infectadas se llevó a cabo utilizando el kit comercial *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con ayuda de un mortero, se pulverizaron unos 100 mg de raíces de plantas infectadas en nitrógeno líquido y se añadieron a un vial con tampón de lisis. A continuación se eliminaron los restos celulares por filtración y centrifugación en columna, y se añadió al lisado etanol 100% y tampón de adhesión para que el ARN se adhiriera a la membrana de unión de ARN proporcionada por el kit. Después de varios lavados, el ARN purificado se eluyó en un volumen de 75 µl de agua desionizada estéril.

Cada muestra de ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 1% agarosa (p/v).

2.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

2.3.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por Roche. Los tratamientos del ADN con una única enzima de restricción o con enzimas que actúan en el mismo tampón, se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se emplearon 100 ng/µl de ADN plasmídico y 1-2 unidades de enzima por microgramo de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10% del

volumen total. En el caso de los tratamientos de ADN genómico (ADNg) para análisis *Southern*, se trataron 5-10 µg de ADN con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima durante no más de 3 horas.

En los tratamientos con dos enzimas que no actúan en el mismo tampón, se añadió primero la enzima cuyo tampón contenía menor concentración salina, y se dejó actuar al menos 1 hora. A continuación, se añadieron las sales necesarias para el funcionamiento óptimo de la segunda, así como la propia endonucleasa, y se prolongó la incubación durante otros 60 minutos a su temperatura óptima de reacción.

Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico.

2.3.2. Defosforilación

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

2.3.3. Unión de fragmentos de ADN

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

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial *pGEM[®]-T Vector System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de su unión, los productos de PCR se purificaron

utilizando el Kit comercial *GENECLEAN® Turbo Nucleic Acid Purification kit* (Bio-101) – véase 2.4.2 – o bien se precipitaron – véase 2.7.2 -.

2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

2.4.1. Geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (“*Agarose SPI*”, Duchefa) disuelta en tampón TAE⁽¹⁾. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos que se querían separar, oscilando entre 0.7 y 2% (p/v). Para poder 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 para geles de agarosa⁽²⁾ 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.

Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se incluyeron rutinariamente los marcadores de tamaño “Enzimax” y “100 bp ladder” (Dominion Biotech), que contienen fragmentos desde 75 pb a 20 kb y desde 80 pb a 1031 pb respectivamente.

1. **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8.0.

2. **Tampón de carga para geles de agarosa:** 0.25% azul de bromofenol p/v; 0.25% azul de xilencianol p/v y 40% sacarosa p/v en 5x TAE.

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

La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó empleando el kit comercial *GENECLEAN® Turbo Nucleic Acid Purification kit* (Bio-101), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y el pH adecuados para la unión del ADN a la membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

2.4.3. Geles con formaldehído

Para realizar análisis de hibridación *northern*, el ARN se separó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de formaldehído (Sambrook y Russell, 2001). Para preparar un gel de 100 ml, se fundió 1 g de agarosa en 84.5 ml de agua estéril y, después de enfriar a 60 °C, se añadieron 10 ml de una solución 10x MOPS⁽¹⁾ y 5.5 ml de 37% formaldehído (v/v).

Las muestras de ARN se desnaturalizaron calentando a 65 °C durante 10 minutos, en presencia de 48% formamida (v/v), 1.4% formaldehído (v/v) pH 7, 15.2 mM 1x MOPS y 0.1% de solución de tinción⁽²⁾ (v/v). A continuación, las muestras se enfriaron en hielo y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal en tampón 1x MOPS, a un voltaje constante de 7-8 V/cm.

1. **Tampón 10x MOPS:** 0.2 M MOPS; 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA pH 8.0.

2. **Solución de tinción:** 0.25% azul de bromofenol (p/v); 1 mM EDTA y 50% glicerol (v/v).

2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de las muestras tanto de ADN como de ARN se determinó midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000, a una longitud de onda de 260 nm. En algunas ocasiones, la cuantificación se realizó por comparación de la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño.

2.6. Hibridación y detección de ácidos nucleicos

2.6.1. Transferencia y fijación de ADN a membranas de nailon para análisis *Southern*

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

(hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en una solución 0.25 N HCl durante 15 minutos. A continuación se realizó una desnaturalización alcalina con una solución 0.5 N NaOH:1.5 M NaCl, durante 15 minutos. Finalmente se neutralizó el ADN sumergiendo el gel en una solución 0.5 M Tris pH 7.5:1.5 M NaCl. A continuación el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche). La transferencia se llevó a cabo en una bandeja conteniendo tampón 10x SSC⁽¹⁾ en la que se colocaron, por orden:

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

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

1. **Tampón 10x SSC:** 1.5 M NaCl y 0.15 M citrato sódico pH 7.0.

2.6.2. Transferencia de ARN a membranas de nailon para análisis *northern*

Una vez terminada la electroforesis, se lavó varias veces el gel en agua destilada estéril. A continuación, el ARN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche). La transferencia se

llevó a cabo durante 12 horas a 4 °C de la manera descrita en el punto 2.6.1., y el ARN se fijó a 80 °C durante 90 minutos. Después, la membrana se tiñó reversiblemente con azul de metileno⁽¹⁾ para visualizar el estado de las muestras.

1. **Azul de metileno:** 0.02% azul de metileno (p/v) y 0.3 M acetato sódico pH 5.5.

2.6.3. Prehibridación

Para los análisis *Southern* y *northern* la membrana con el ADN fijado se incubó a 50 °C durante un mínimo de 1 hora con agente de bloqueo *DIG Easy Hyb* (Roche) a razón de 0.3 ml/cm² de membrana. Para la preparación del agente de bloqueo se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.6.4. Hibridación

La hibridación se realizó a 50 °C durante 12 horas con solución de hibridación⁽¹⁾ a 0.3 ml/cm² de membrana. Para desnaturalizar la sonda antes de la hibridación, se incubó la solución de hibridación a 100 °C durante 10 minutos y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 minutos. Tras su uso, la solución de hibridación se conservó a -20 °C para su posterior reutilización, desnaturalizándose previamente.

1. **Solución de hibridación:** 25 ng/ml de sonda marcada con digoxigenina en solución de prehibridación.

2.6.5. Lavados y detección

Una vez retirada la solución de hibridación, los filtros se lavaron dos veces con una solución 2x SSC: 0.1% SDS (v/v) a temperatura ambiente durante 5 minutos y con agitación. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 minutos a 50 °C con una solución precalentada de 0.5x SSC: 0.1% SDS (v/v). Posteriormente se equilibró con tampón 1⁽¹⁾ (0.5 ml/cm² de membrana) a temperatura ambiente durante 2-5 minutos, y se bloqueó con tampón 2⁽²⁾ (1 ml/cm² de membrana), también a temperatura ambiente durante 30 minutos. La siguiente incubación se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos con tampón 2 (0.2 ml/cm² de membrana) conteniendo anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina

(750 U/ml, Roche) diluido 1:20000 para análisis *Southern* o *northern*. A continuación, se lavó la membrana 2 veces durante 15 minutos con tampón 1 (1 ml/cm² de membrana) conteniendo 0.3% Tween 20 (v/v) y se equilibró con tampón 3⁽³⁾ (0.2 ml/cm² de membrana) durante 15 minutos.

La detección se llevó a cabo por la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato CDP-Star^{®(4)} (Roche) que da lugar a una señal luminosa que puede ser detectada por quimioluminiscencia. Para ello, se colocó la membrana sobre una pieza de acetato y se le añadió la solución CDP-Star^{®(5)} (1 ml/100 cm² de membrana). Posteriormente, la membrana se cubrió con otra pieza de acetato y se retiró el exceso de líquido. Finalmente, se capturó la imagen emitida con la cámara oscura Fujifilm LAS-3000.

1. **Tampón 1:** 0.1 M ácido maleico y 0.15 M NaCl pH 7.5
2. **Tampón 2:** 1% agente de bloqueo de Roche (p/v) en tampón 1.
3. **Tampón 3:** 0.1M Tris-HCl y 0.1 M NaCl pH 9.5.
4. **CDP-Star[®]:** disodio de 4-cloro-3-(metoxispiro (1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro) triciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan)-4-il) fenil fosfato.
5. **Solución CDP-Star[®]:** 1% en tampón 3 (v/v).

2.6.6. Retirada de la sonda y rehibridación

Para poder rehibridar con una nueva sonda la membrana empleada en el análisis *Southern*, es necesario retirar la sonda utilizada previamente. Para ello, siguiendo el manual de uso del sistema "DIG" de Roche, se lavó dos veces la membrana con agua destilada estéril a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se incubó dos veces con una solución 0.2 M NaOH: 0.1% SDS (p/v) a 37 °C durante 10 minutos, con agitación suave. Por último, se lavó dos veces con una solución 2x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminados los lavados, se volvió a prehibridar e hibridar con la nueva sonda siguiendo los procesos descritos en los puntos 2.6.3 y 2.6.4.

2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.7.1. PCR estándar

Para la amplificación estándar de fragmentos de ADN se emplearon polimerasas termoestables (FIRE POL[®] TAQ de Dominion Biotech o Expand High Fidelity PCR System de Roche), en las condiciones de reacción indicadas en la tabla. La reacción se llevó a cabo con 300 nM de cada uno de los dos cebadores empleados, una concentración 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs y 0.05 U/μl de polimerasa. La cantidad de ADN molde empleada fue de 20 ng/μl cuando se amplificó ADN genómico o 2 ng/μl cuando se usó ADN plasmídico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se detallan en la tabla 9:

Tabla 9. Condiciones estándar de PCR. Tan es la temperatura de unión de los cebadores al molde, y text es el tiempo de extensión de la reacción (en general, 1 minuto/kb de amplificación).

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Número de ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 35 segundos | |
| Unión del cebador | Tan | 35 segundos | 30 |
| Extensión | 72 °C | text | |
| Extensión final | 72 °C | 7 minutos | 1 |
| | 10 °C | indefinido | |

2.7.2. Precipitación con isopropanol de los productos de PCR

Esta técnica se utilizó cuando el producto de PCR obtenido era único, con el fin de eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes de la reacción de PCR. Para ello, se añadió un volumen de una solución 4 M de acetato amónico pH 5.2 y tres volúmenes de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y, posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, se lavó el sedimento en dos ocasiones con 70% etanol (v/v) y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

2.7.3. Mutagénesis mediante superposición

El protocolo está basado en el descrito por Ho y colaboradores (1989), que consiste en la introducción de mutaciones dirigidas y localizadas empleando la técnica de PCR (Figura 5). Se diseñó una pareja de oligonucleótidos complementarios (llamados 1 y 2) que contenían la mutación que se deseaba introducir, centrada dentro del fragmento de interés. Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos que flanqueaban la región a amplificar (llamados “a y b”). La temperatura de unión al molde de los cebadores 1 y 2 fue mayor que la de los cebadores “a y b”.

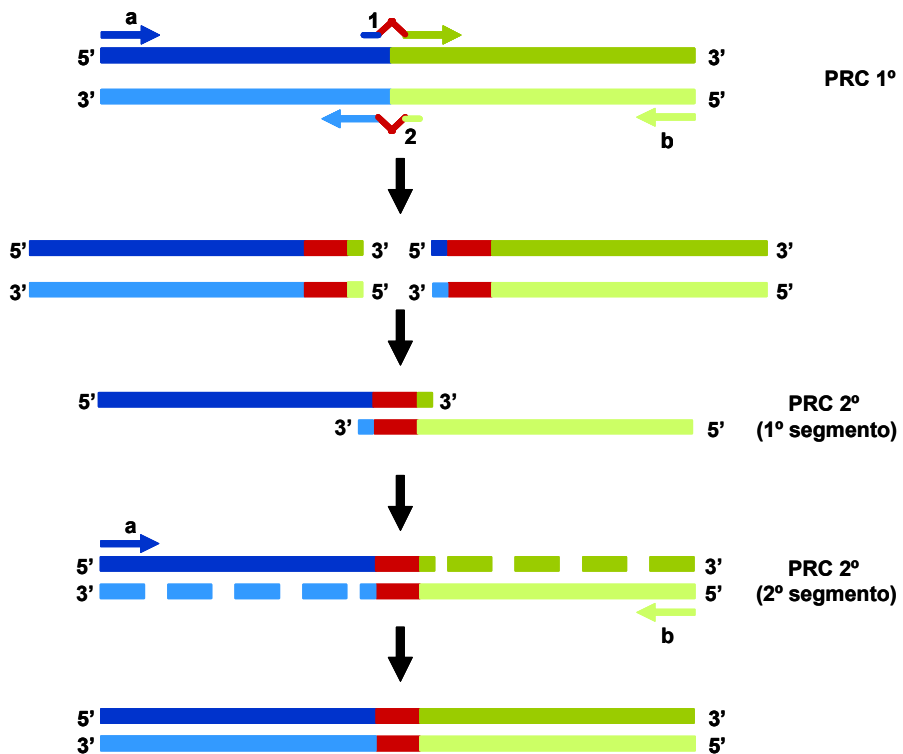


Figura 5. Esquema de la técnica de mutagénesis mediante superposición.

Se realizó una primera PCR empleando las parejas de cebadores a+2 y 1+b. El producto de PCR obtenido en cada reacción se purificó usando el kit comercial *GENECLEAN Turbo Nucleic Acid Purification kit* –véase 2.4.2- evitando co-purificar restos del molde original que pudieran interferir en las reacciones posteriores.

A continuación, se realizó una segunda PCR utilizando como molde los fragmentos amplificados en las reacciones anteriores. Dicha PCR constó de dos segmentos. El primero se llevó a cabo a la temperatura de unión de los cebadores internos 1 y 2, para que los dos fragmentos de ADN obtenidos de forma independiente en la primera reacción de PCR aparearan entre sí por la región complementaria correspondiente a dichos oligonucleótidos. En este primer segmento, la polimerasa completa las cadenas hasta obtener un único fragmento bicatenario. El segundo segmento se realizó a la temperatura de unión de los cebadores externos a y b, con un tiempo de extensión equivalente al fragmento completo de ADN. Durante esta etapa, la polimerasa amplificó la secuencia completa (Figura 5).

Las condiciones de la PCR variaron según la polimerasa utilizada. El producto de la segunda PCR se purificó con el kit comercial *GENECLEAN Turbo Nucleic Acid Purification kit* y se clonó en el vector pGEM-T[®], del modo indicado en el punto 2.3.3.

2.7.4. Cuantificación *in planta* de ADN genómico de *F. oxysporum* mediante PCR a tiempo real

Para la cuantificación y detección específica de las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$ de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* durante experimentos de coinfección de plantas de tomate se llevaron a cabo experimentos de amplificación de fragmentos de ADN fúngico presente en muestras de ADN total purificado a partir de plantas infectadas. Para ello se utilizaron parejas de oligonucleótidos que detectan específicamente fragmentos de ADN presentes en la estirpe silvestre o en el mutante $\Delta chsV$ (ChsV-3 + ChsV-26 y GpdA-16 + ChsV-6, respectivamente) (ver tablas 4 y 5).

Las mezclas de reacción contenían 12.5 μ l de *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad), 300 nM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico total purificado a partir de tallos de plantas infectadas, en un volumen final de 25 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos (BioRad) en un termociclador *iCycler iQ Real-time PCR System* de BioRad, de acuerdo con el protocolo descrito en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de amplificación de la PCR a tiempo real para la cuantificación *in planta* de *F. oxysporum*.

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Numero de ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | |
| Unión del cebador | 60-62 °C | 30 segundos | 40 |
| Extensión | 72 °C | 45 segundos | |
| Medida de fluorescencia | 80 °C | 20 segundos | |

Terminada la PCR se realizó una curva de desnaturalización para analizar los productos obtenidos tras la PCR. Para ello se programó el equipo para que se produjera un aumento de 0.5 °C cada 10 segundos, comenzando a los 55 °C hasta alcanzar los 95 °C. En estas condiciones se generaron productos específicos y no se detectaron dímeros de cebadores.

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

2.7.5. Transcripción inversa de ARN (RT-PCR)

A. Eliminación de restos de ADN en muestras de ARN

En primer lugar, el ARN purificado se trató con la enzima DNasa I (Fermentas) durante 30 minutos a 37 °C, a razón de 0.1 µg/µl de ARN y 0.1 U/µl de enzima. Para detener la acción de la DNasa 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.

B. Síntesis de ADN copia

Para la síntesis de ADN copia (ADNc), el ARN previamente tratado con DNasa I se sometió a transcripción inversa usando la transcriptasa inversa M-MLV (“Moloney Murine Leucemia Virus” Reverse Transcriptase, Invitrogen). En un volumen final de 20 μ l se mezcló 1 μ g de ARN total con 100 pmol del cebador oligodT y se desnaturalizó calentando a 70 °C durante 10 minutos. A continuación se mantuvo en hielo y se añadieron 0.4 mM de dNTPs, 1x tampón *First Strand Buffer* (Invitrogen), 4 U/ μ l del inhibidor de RNAsas *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega) y 5 mM de Ditioneitol (DTT). A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y, transcurrido ese tiempo, se añadió la retrotranscriptasa (10 U/ μ l). Se incubó la reacción a 37 °C durante 50 minutos y finalmente se calentó a 70 °C durante 15 minutos, para inactivar la enzima.

2.7.6. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo final

Una vez sintetizado el ADNc, se realizó una PCR estándar empleando como molde 0.05 – 0.1 μ l del ADNc sintetizado en la transcripción inversa por microlitro de volumen de reacción de PCR. Una vez terminada la reacción de PCR, las muestras se cargaron en geles de agarosa.

2.7.7. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado, en placas de 96 pocillos (BioRad), en un equipo iCycler iQ Real-time PCR System (BioRad), usando 12.5 μ l de iQ SyBR Green Supermix (BioRad), 2 μ l de cDNA y 300 nM de cada oligonucleótido, en un volumen final de 25 μ l. Todas las parejas de cebadores utilizadas amplificaron productos de 160 a 200 pb. Las condiciones de amplificación se exponen en la tabla 11:

Tabla 11. Condiciones de amplificación usadas en el análisis de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Numero de ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | 40 |
| Unión del cebador | 60 °C | 30 segundos | |
| Extensión | 72 °C | 30 segundos | |
| Medida de fluorescencia | 80 °C | 20 segundos | |

Terminada la PCR se realizó una curva de desnaturalización para analizar los productos obtenidos tras la PCR. Para ello se programó el equipo para que se produjera un aumento de 0.5 °C cada 10 segundos, comenzando a los 55 °C hasta alcanzar los 95 °C. En estas condiciones se generaron productos específicos, sin que se detectaran dímeros de los cebadores.

Para el cálculo de la eficiencia (E) de las reacciones de RT-PCR a tiempo real, se realizaron diluciones seriadas del ADNc hasta valores 1; 0.1; 0.01 y 0.001, 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 (C_t) de la amplificación, según la ecuación:

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

Las eficiencias obtenidas fueron óptimas: 2.06 para *gapdh*; 2.01 para *lin6*; 2.10 para *gluA*; 2.03 para *gluB*; 2.05 para *chi3*; 2.07 para *chi9*; 1.99 para *pr1*. En todos los casos la linealidad fue elevada (coeficiente de regresión \geq 0.992).

Los niveles de expresión relativa se calcularon siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. (Pfaffl, 2001; Livak y Schmittgen, 2001):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(1 + E_{\text{interés}})^{\Delta C_{\text{interés}}}}{(1 + E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{\text{referencia}}}} = 2^{-\Delta \Delta C_{\text{t}}}$$

donde $\Delta C_{\text{referencia}}$ se calculó como la diferencia entre el ciclo umbral de amplificación del gen de interés y el ciclo umbral de amplificación del gen de referencia endógena (*gapdh*) en la condición tomada como referencia; y $\Delta C_{\text{interés}}$ se calculó del mismo modo para la condición de interés.

2.7.8. PCR de marcaje

Para los análisis de hibridación *Southern* y *northern* 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*. En el caso de sondas unicasenarias, solo se utilizó el oligonucleótido antisentido como cebador.

La purificación de la sonda se realizó mediante precipitación añadiendo 10% de una solución 8 M de cloruro de litio (v/v) y 3 volúmenes de 100% etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Posteriormente se lavó con 70% etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada.

2.8. Transformación genética

2.8.1. Transformación de *Escherichia coli*

La obtención y transformación de las células competentes congeladas, se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1985) con algunas modificaciones.

A. Obtención de células competentes

Una colonia fresca de *E. coli* XL1-Blue se inoculó en 5 ml de PSI-b⁽¹⁾ y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Todo el cultivo estacionario se transfirió a 100 ml de PSI-b en un matraz de 1 l (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la densidad óptica del cultivo a 550 nm fue de 0.45-0.5. A continuación, se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 5000 g. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 ml de solución Tfb-1⁽²⁾ fría. Después de incubar 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 5000 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 ml de solución Tfb-2⁽³⁾ fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 minutos, se repartieron en alícuotas de 100 µl en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

1. PSI-b: 5 g/l yeast extract; 20 g/l triptona y 5 g/l MgSO₄ · 7H₂O. Ajustar a pH 7.6 con KOH. Esterilizar en autoclave.

2. Solución Tfb-1: 30 mM acetato potásico pH 6.9; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂ y 15% glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

3. Solución Tfb-2: 10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl y 15% glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

B. Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelaron en hielo. A 50 µl de éstas se les añadió 5 µl de la solución que contiene el ADN y se incubaron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 90 segundos y se dejaron 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 y sin agitación durante 15 minutos con 100 µl de medio LB. Por último, se sembró toda la mezcla de transformación en placas de medio selectivo, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 12-14 horas. En el caso de plásmidos con genes de resistencia a otros antibióticos, las células se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 hora en 1 ml de medio LB. Posteriormente se centrifugaron para recoger las células y se resuspendieron

en 150 μ l de medio LB, que se sembraron en placas de medio selectivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12-14 horas.

2.8.2. Transformación genética de *F. oxysporum*

A. Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (1990), con modificaciones. Se inoculó una colonia aislada, procedente de una microconidia, en 100 ml de medio PDB y se cultivó durante 3-5 días – véase 2.1.3-. Transcurrido este tiempo se recogieron las microconidias y se inocularon 10^9 en 200 ml de medio PDB. Después de 12-14 horas de incubación, se recogieron las germínulas por filtración con un filtro de nailon (Monodur, 10-15 μ m) y se lavaron con abundante solución MgP⁽¹⁾. A continuación, se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 ml de solución MgP conteniendo 0.5% (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (Lallzyme de Lallemand S.A. o Glucanex[®] de Novozymes). El tratamiento enzimático se prolongó durante 45 minutos a 30 °C y con agitación muy suave. Transcurrido este tiempo, se comprobó al microscopio la formación de protoplastos. Cuando el número y la calidad de los protoplastos fueron adecuados, se filtró la muestra a través de dos filtros de nailon (Monodur, 10-15 μ m) y se lavó con dos volúmenes de solución STC⁽²⁾. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C y a 1500 g durante 15 minutos para recoger los protoplastos obtenidos. Éstos se resuspendieron suavemente en 1 ml de solución STC y se determinó su concentración, utilizando una cámara de Thoma. Se repartieron en alícuotas de 100 μ l a una concentración de 2×10^8 protoplastos/ml. A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80 °C, después de añadirles 10% de solución PEG⁽³⁾ (v/v) y 1% de DMSO (Merck) (v/v).

1. **Solución MgP:** 1.2 MgSO₄; 10 mM Na₂HPO₄, pH 5.8-6.0 ajustado con ácido ortofosfórico.

2. **Solución STC:** 0.8 M sorbitol; 50 mM CaCl₂ y 50 mM Tris-HCl, pH 7.5.

3. **Solución PEG:** 60% polietilenglicol MW6000 (p/v) en 0.6 M MOPS.

B. Transformación de protoplastos

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malardier y colaboradores (1989), con algunas modificaciones. En un vial se mezclaron 1-2 µg de ADN transformante con 10 µl de ácido aurintricarboxílico (fuerte inhibidor de nucleasas) y se llevaron hasta un volumen final de 60 µl con solución TEC⁽¹⁾. Para experimentos de cotransformación, se añadió 1 µg del ADN que confiere resistencia al antibiótico de selección y doble cantidad del ADN de interés. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos, al igual que los protoplastos obtenidos según el protocolo descrito. Transcurrido este tiempo, se mezcló suavemente la solución de ADN con los protoplastos y, de nuevo, se incubó en hielo durante 20 minutos. Seguidamente se añadieron 160 µl de solución PEG y se prolongó la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de los cuales se añadió 1 ml de solución STC. Se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm para recoger los protoplastos y se resuspendieron en 200 µl de solución STC. Posteriormente se mezclaron alícuotas de 50 µl de la solución de protoplastos con 3 ml de agar de cobertera⁽²⁾ a 45 °C, y se sembraron en medio sólido de regeneración. Se incubaron a 28 °C durante un período de tiempo que varía en función del antibiótico de selección, para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina B, se incubaron durante 20 horas, y para la selección con fleomicina, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 ml de agar de cobertera conteniendo el antibiótico de selección, 2 mg de higromicina B o 160 µg de fleomicina. Por último, se prosiguió la incubación 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 microconidia).

1. Solución TEC: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl₂.

2. Agar de cobertera: 0.4% agar (Oxoid) (p/v) en medio de regeneración.

2.9. Construcción de alelos mutantes

2.9.1. Construcción de alelos interrumpidos

La interrupción dirigida de genes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se llevó a cabo incorporando al menos un sitio de restricción *Bam*HI en la región codificante del gen de interés, utilizando la técnica de mutágenesis mediante superposición (Ho *et al.*, 1989), con el fin de poder insertar el casete que confiere resistencia a higromicina B (Mullaney *et al.*, 1985; Punt *et al.*, 1990) interrumpiendo la fase codificante del gen (Figura 6).

Una vez creado el nuevo sitio *Bam*HI, se clonó el alelo mutante en el vector pGem[®]-T. A continuación se linearizó el vector por tratamiento con *Bam*HI, se purificó y se eliminaron los grupos fosfatos mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (SAP).

Paralelamente, el vector con el casete de resistencia a higromicina B se sometió a tratamiento con *Bam*HI, para su liberación y clonación en el vector defosforilado portador del gen de interés, utilizando la ligasa del fago T4. Posteriormente se transformó *E. coli* con este vector.

El plásmido portador del alelo interrumpido se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos externos a la construcción, y la banda amplificada se empleó para la transformación de protoplastos de la estirpe silvestre (4287) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La creación de un alelo interrumpido del gen *tom1* se llevó a cabo incorporando un sitio *Bam*HI en la posición 90 de la región codificante, utilizando las parejas de oligonucleótidos Tom1-8 + Tom1-9B y Tom1-3 + Tom1-10B (Tabla 5). El alelo interrumpido fue finalmente amplificado con los oligonucleótidos Tom1-3 + Tom1-8 (Tabla 5).

La creación de un alelo interrumpido del gen *con7-1* se llevó a cabo incorporando dos sitios *Bam*HI en las posiciones 944 y 1174 de la región codificante para sustituir el dominio de unión a ADN del gen por el casete que

confiere resistencia a higromicina B. Para crear los nuevos sitios de restricción se utilizaron los oligonucleótidos Con71-7, Con71-10, Con71-11B, Con71-12B, Con71-13B y Con71-14B (Tabla 5). La construcción de interrupción del gen *con7-1* fue amplificada con los cebadores Con71-7 + Con71-10 (Tabla 5).

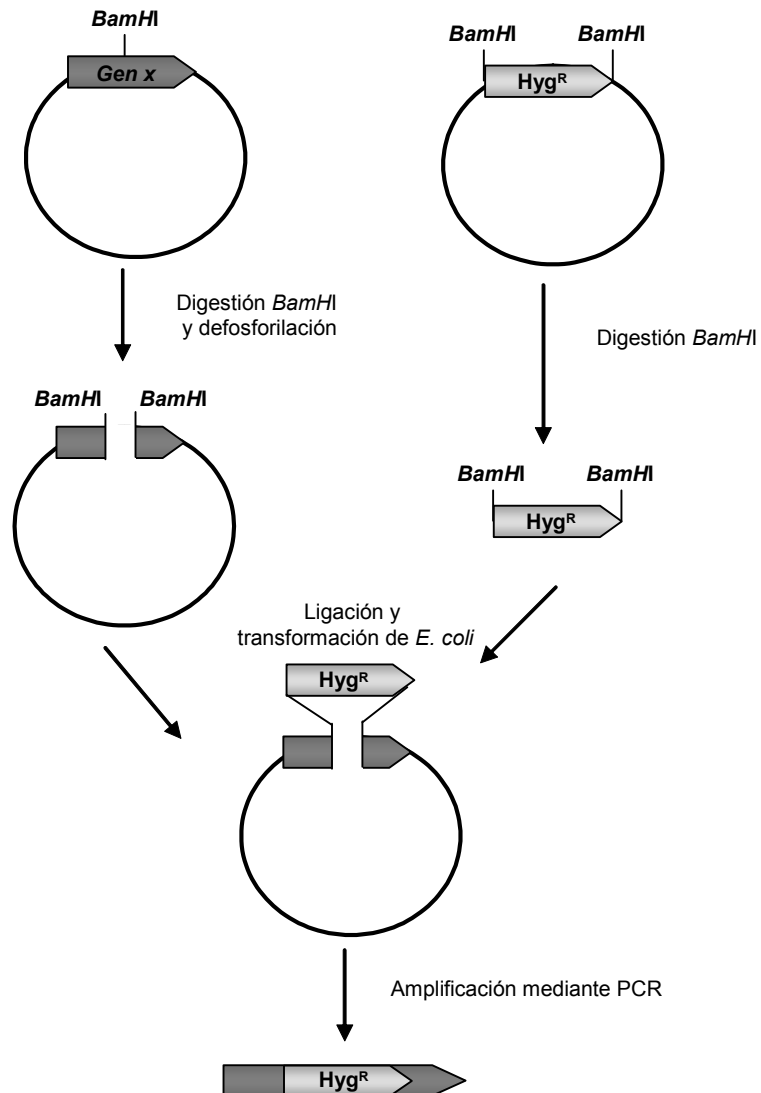


Figura 6. Estrategia empleada para la construcción de vectores utilizados para la interrupción dirigida de genes de interés de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Por último, la creación del alelo interrumpido para los genes *con7-2* y *con7-3* se llevó a cabo incorporando un sitio de restricción *BamHI* en la posición 592, utilizando los cebadores Con72-1 + Con72-6B y Con72-4 + Con72-5B (Tabla 5). Además, en este caso se utilizó un sitio *BamHI* existente en el promotor de los genes *con7-2* y *con7-3*, para sustituir parte del promotor y del comienzo de la ORF por el casete de resistencia a higromicina B. La construcción de interrupción fue amplificada con los oligonucleótidos Con72-1 y Con72-4 (Tabla 5).

2.9.2. Construcción de alelos con expresión constitutiva

Un fragmento de 1.16 kb conteniendo la región codificante de *tom1* completa fue amplificado por PCR estándar a partir de ADN genómico de *F. oxysporum* utilizando los oligonucleótidos Tom1-x1 (Tabla 5), que contiene un sitio *XbaI* en el extremo 5', y Tom1-3 (Tabla 5).

El fragmento obtenido se clonó en pGem-T, y el nuevo plásmido se sometió a tratamiento con las endonucleasas *XbaI* y *SpeI* para liberar la región codificante de *tom1* con extremos *XbaI* y *SpeI* (Figura 7).

Paralelamente se trató un vector portador del promotor *PgpdA* con estas mismas enzimas, se eliminaron los grupos fosfatos del extremo con fosfatasa alcalina (SAP), y se utilizó para clonar en fase con el promotor *PgpdA* el fragmento de *tom1* purificado (Figura 7). La fusión completa se amplificó por PCR con los oligonucleótidos *gpdA-6H* y Tom1-3 (Tablas 4 y 5).

Por otro lado, se amplificó un fragmento de 3 kb conteniendo el casete de resistencia a fleomicina a partir del plásmido pAN8-1, utilizando los cebadores *gpd-2k* y *trpter-2k* (Tabla 4). Ambos productos de PCR se utilizaron para co-transformar protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

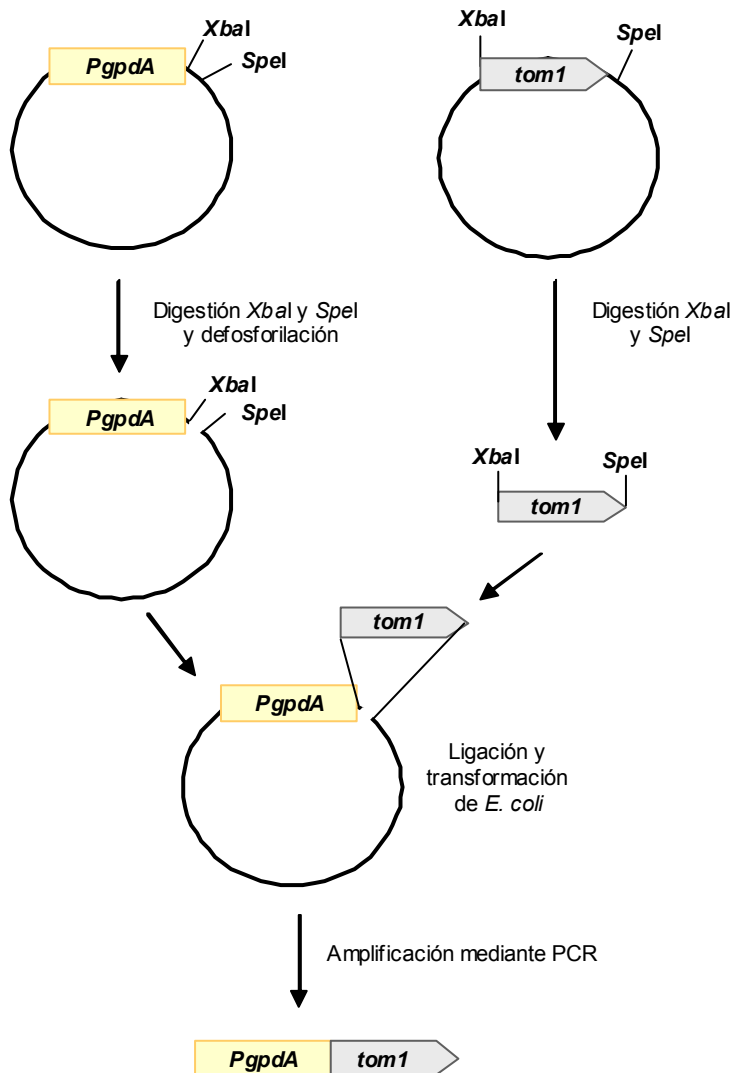


Figura 7. Esquema de la estrategia empleada para la construcción de un alelo constitutivo para el gen *tom1*.2.9.

2.10. Ensayos de infección

2.10.1. Infección de plantas

Para estudiar el patotipo de las distintas estirpes de *F. oxysporum* utilizadas en este trabajo se infectaron plantas de tomate (cv. Monika). Las semillas fueron proporcionadas por Syngenta (El Ejido, Almería).

Las plantas se cultivaron del modo descrito anteriormente –véase 2.1.3- hasta que presentaron su primera hoja verdadera y, posteriormente, sus raíces se sumergieron en una suspensión conteniendo 5×10^6 esporas/ml (concentración 1x), 5×10^5 esporas/ml (concentración 0.1x) o una mezcla de esporas de varias estirpes a las concentraciones indicadas durante 30 minutos. A continuación, se trasplantaron a celdas individuales con vermiculita y se incubaron en cámaras de cultivo con condiciones ambientales controladas –véase 2.1.3-.



Figura 8. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Huertas-González *et al.*, 1999)

Durante las tres semanas siguientes a la infección, se evaluó la evolución de la enfermedad. Para ello se utilizaron los índices de enfermedad descritos por Huertas-González y colaboradores (1999) que corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y pecíolos caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido, y 5, planta muerta (Figura 8).

Para los ensayos de colonización fúngica, expresión de genes de defensa de planta y expresión de genes que codifican enzimas fúngicas de degradación de paredes celulares (cell wall degrading enzymes, CWDEs), la infección se realizó en matraces, sumergiendo las raíces en suspensiones de esporas e incubando en una cámara de cultivo a 28 °C y 80 rpm durante 1, 3,

5 y 7 días. Después de la incubación, se recogieron por separado las raíces y los tallos, que fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización.

2.10.2. Infección de frutos de tomate

El patotipo de las diferentes estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se analizó también mediante su inoculación en frutos de tomate (variedad Daniela o Liso). Los frutos de tomate se lavaron bien con agua, se sumergieron durante 5 minutos en 96% etanol (v/v) y se dejaron secar en el interior de una cámara de flujo laminar. A continuación se inyectaron 5 µl de una suspensión conteniendo 10^8 esporas/ml en la epidermis del fruto. Los tomates inoculados se incubaron a 28 °C con una humedad relativa del 100%. El proceso de infección se observó a lo largo de seis días.

2.11. Ensayo de actividad tomatinasa

A. Obtención de extracto crudo de *F. oxysporum*

Se inocularon 10^6 esporas frescas en 5 ml de medio CA líquido en ausencia o presencia de 30 µg/ml de α-tomatina⁽¹⁾ (Extrasynthèse) y se incubaron durante 48 horas a 28 °C y 170 rpm. A continuación, los cultivos fueron filtrados a través de un filtro de nailon (Monodur, 10-15 µm) para eliminar el micelio, y filtros Millipore con diámetro de poro de 0.22 µm, para eliminar las esporas. La mezcla de proteínas extracelulares que contienen los filtrados fue precipitada añadiendo 2.5 volúmenes de acetona fría (gota a gota y en agitación) e incubando en hielo un mínimo de 2 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 25 minutos a 10000 rpm, el sobrenadante fue desechado y el sedimento, una vez seco, fue resuspendido en 500 µl de agua desionizada. La concentración de proteínas en los extractos crudos fue determinada mediante el método Bradford utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

B. Ensayo bioquímico de actividad tomatinasa

La actividad tomatinasa fue medida por espectrofotometría a 525 nm utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de azúcares reducidos (Miller, 1959). La mezcla de reacción conteniendo 50 mM de tampón sodio-acetato pH 4.5, 2 mg/ml de α-tomatina y 6.5 µg de extracto

crudo en un volumen final de 200 μ l, se incubó durante 12-14 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 200 μ l de solución DNS⁽²⁾ a cada muestra, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se llevaron a un volumen final de 1 ml con agua. La absorbancia fue medida a 525 nm. Se prepararon controles negativos con extractos crudos incubados con 50 mM de tampón sodio-acetato pH 4.5 en ausencia de la saponina.

1. α -tomatina: Fue disuelta a la concentración deseada en 50 mM de tampón sodio-acetato pH 4.5 a 4 °C con agitación suave.

2. Solución DNS: Disolver 1 g de DNS en 20 ml de NaOH 2 N a 80-90 °C. Disolver 30 g de tartrato sódico potásico en 50 ml de H₂O. Mezclar las dos soluciones y enrasar a 100 ml.

2.12. Cromatografía en capa fina (TLC)

Se incubaron alícuotas de 1.5 ml de filtrado de cultivo de hongos – veáse 2.10. - con 500 μ l de α -tomatina a concentración final 5 mM durante 12-14 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron secadas por centrifugación en vacío y resuspendidas en 350 μ l de metanol. Los productos de degradación de la saponina fueron separados en una placa de gel de sílice (General Purposes, Sigma), en solvente compuesto de ácido acético, acetato de etilo, metanol y agua a razón 10:30:20:1 (v/v). La presencia de azúcares fue visualizada tras pulverizar las placas con 50% de ácido sulfúrico (v/v) seguida de una incubación a 110 °C durante unos 10 minutos. Los metabolitos fueron identificados por comparación con los estándares α -tomatina y tomatidina, ambos a concentración 5 mM.

2.13. Ensayo de sensibilidad a α -tomatina

Alícuotas de 2.5×10^6 microconidias fueron inoculadas en el centro de placas de medio CA sólido pH 7.0 suplementado con diferentes concentraciones de α -tomatina. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. La sensibilidad al compuesto fue determinada mediante la medida del diámetro de la colonia y del halo de degradación que la rodea.

2.14. Detección de actividad quitinasa

A. Obtención de extractos crudos de plantas infectadas

Los tallos de 4 plantas infectadas fueron lavados con agua, secados cuidadosamente y pulverizados en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero. Las muestras fueron homogenizadas en 0.05 M de tampón fosfato a pH 6.0 mediante agitación vigorosa, seguida de una incubación a 4 °C durante 2 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 g y 4 °C, y el sobrenadante fue conservado a -20 °C. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método Bradford, usando la solución comercial BioRad protein assay (BioRad), con BSA como estándar.

B. Actividad quitinasa

Las actividades endo- y ex- quitinasas fueron medidas empleando el kit comercial *Chitinase Assay Kit Fluorimetric* (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la hidrólisis enzimática de diferentes sustratos para las diferentes actividades quitinasas (quitobiosidasa, β -N-acetilglucosaminidasa y endoquitinasa). Después de incubar 10 μ l de extracto crudo de plantas con los diferentes sustratos en un ambiente ácido (pH 5), a 37 °C durante 60 minutos, se libera 4-metilumbeliferona (4MU) de cada sustrato, la cual, tras una ionización a pH básico, fue medida en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión a 450 nm. La actividad quitinasa se expresó como nanogramos de 4MU liberados de cada sustrato por microgramo de proteína.

2.15. Ensayo de inhibición fúngica

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo por inoculación simultánea de 2.5×10^5 esporas/ml de las estirpes FoH1::ChFP, con la histona H1 marcada con la proteína roja fluorescente, y resistente al antibiótico fleomicina, y la mutante $\Delta chsV$, resistente al antibiótico higromicina, en medio mínimo SM. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 170 rpm. Después de 0, 2, 4, 6 y 8 horas, se tomaron alícuotas, se diluyeron y se sembraron en placas de medio mínimo con higromicina o fleomicina. La inhibición fúngica se estimó mediante recuento de las colonias crecidas tras

la incubación durante 2 días a 28 °C. Los experimentos control consistieron en la inoculación de 5×10^5 esporas/ml de cada estirpe por separado en medio mínimo. Adicionalmente, se inocularon 10^3 esporas de cada estirpe simultáneamente en placas de medio sólido SM, y se incubaron a 28 °C durante 7 días.

2.16. Análisis filogenético

Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas usando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Se empleó el programa phyml v2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003) para realizar un análisis filogenético de 1000 repeticiones no paramétricas del alineamiento obtenido usando el método de máxima verosimilitud tras la optimización del modelo de sustitución rtREV (Dimmic *et al.*, 2002) con el programa modelgenerator v84 (Keane *et al.*, 2006). Los parámetros utilizados para este análisis fueron una distribución gamma de 8 categorías y un parámetro alpha de 3.19. La relación filogenética entre las secuencias de las diferentes proteínas incluidas en este estudio se mostraron en árboles filogenéticos construidos con el programa TreeView v1.6.6 (Page, 1996).

Capítulo 1

La enzima tomatinasa es necesaria para la virulencia completa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate

Pareja-Jaime *et al.*, 2008

1. Introducción

Como consecuencia de su metabolismo secundario, las plantas producen compuestos que presentan actividad antimicrobiana y que han sido clasificados como fitoanticipinas (Vanetten *et al.*, 1994). Los patógenos de plantas deben, por tanto, detoxificar estos compuestos para desarrollar su proceso de infección. Las plantas de tomate producen la saponina α -tomatina (Figura 9), un glicoalcaloide esteroidal formado por el aglicón tomatidina y el oligosacárido β -licotetraosa, compuesto a su vez por cuatro azúcares (una molécula de galactosa, una de xilosa y dos de glucosa), y que presenta actividad antifúngica. La α -tomatina está presente en raíz, tallo, hojas y frutos verdes, alcanzando concentraciones de hasta 1 mM en algunas áreas (Roddick, 1977). Al igual que otras saponinas, el efecto tóxico de la α -tomatina se atribuye a su habilidad para formar complejos con los 3β -hidroxi-esteroides de la membrana plasmática de los hongos, causando poros que conducen a la lisis del contenido celular (Roddick, 1979; Keukens *et al.*, 1992; 1995).

Se ha demostrado que los patógenos de tomate son menos sensibles a la α -tomatina que los no patógenos (Arneson y Durbin, 1967a; 1967b; Steel y Drysdale, 1988; Suleman *et al.*, 1996), siendo posible que estos microbios desarrollen mecanismos para eludir los efectos tóxicos del compuesto (Osbourn, 1996; Morrissey y Osbourn, 1999; Vanetten *et al.*, 2001). Algunos patógenos toleran las saponinas mediante mecanismos pasivos, como la ausencia de esteroides en sus membranas plasmáticas, lo que evita que la tomatina se pueda unir a los esteroides produciendo la lisis celular (Arneson y Durbin, 1967a; 1967b; Defago y Kern, 1983; Keukens *et al.*, 1992). Otros producen enzimas específicas, colectivamente denominadas tomatinasas, que eliminan al menos un azúcar del tetrasacárido de la α -tomatina, lo que parece ser suficiente para su detoxificación. Este es el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que expresa al menos una proteína extracelular con actividad tomatinasa (Ford *et al.*, 1977; Roldán-Arjona *et al.*, 1999), ya que

durante su proceso de infección de la planta se encuentra con niveles inhibitorios de la saponina.

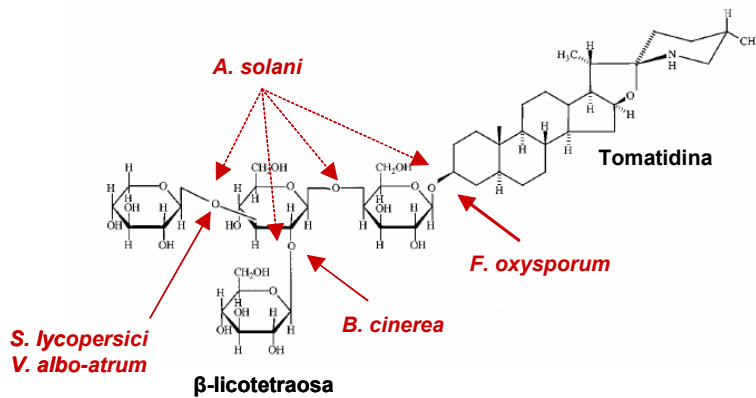


Figura 9. Esquema de la molécula de α -tomatina. Las flechas indican los sitios de hidrólisis de diferentes enzimas tomatinasas de distintos patógenos.

A pesar de que las enzimas tomatinasas han sido identificadas en muchos patógenos de tomate, como *Septoria lycopersici* (Arneson y Durbin, 1967a; 1967b; Durbin y Uchytel, 1969), *Verticillium albo-atrum* (Sandrock y Vanetten, 1998), *Botrytis cinerea* (Quidde *et al.*, 1998), *Fusarium oxysporum* (Lairini *et al.*, 1996), *Fusarium solani* (Lairini y Ruiz-Rubio, 1998) o *Alternaria solani* (Schönbeck y Schlösser, 1976), todos ellos no comparten el mismo mecanismo de acción, e incluso parecen pertenecer a diferentes familias de proteínas (Figura 9). Mientras que las tomatinasas de *S. lycopersici* y *V. albo-atrum*, pertenecientes a la familia 3 de las β -glicosil hidrolasas, eliminan una molécula de glucosa para originar β_2 -tomatina (Sandrock y Vanetten, 1998), la enzima de *B. cinerea* cataliza la hidrólisis de la xilosa para producir β_1 -tomatina (Quidde *et al.*, 1998). Por otro lado, la tomatinasa de *A. solani* degrada la saponina hasta tomatidina mediante la liberación secuencial de los cuatro monosacáridos de la β -licotetraosa (Schönbeck y Schlösser, 1976). La tomatinasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que pertenece a la familia 10 de las β -glicosil hidrolasas, rompe el enlace que une las dos partes de la molécula para originar tomatidina y el tetrasacárido β -licotetraosa completo (Lairini *et al.*, 1996). Varias tomatinasas pertenecientes a la familia 10 de las β -glicosil hidrolasas han sido descritas en el patógeno de tomate *Gibberella pulicaris* (Weltring *et al.*, 1998) y en las bacterias *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis* (Kaup *et al.*, 2005) y *Streptomyces turgidiscabies* (Kers *et al.*, 2005).

A pesar de que se conocen numerosas saponinas, la importancia de estas en la patogenicidad fúngica aún no se ha determinado. Hasta el momento, se ha confirmado su participación en la interacción entre *Gaumannomyces graminis* var. *avenae* y plantas de avena (Bowyer *et al.*, 1995). La obtención de mutantes avenacinasa deficientes mediante interrupción dirigida en *G. graminis* var. *avenae* reveló que la enzima era esencial para la patogénesis en avena (Bowyer *et al.*, 1995). Sin embargo, los mutantes deficientes en enzimas tomatinasas de *S. lycopersici* (Martín-Hernández *et al.*, 2000) y de *Colletotrichum coccodes* (Sandrock y Vanetten, 2001) resultaron tener un fenotipo virulento. Por otro lado, la expresión heteróloga del gen tomatinasa de *S. lycopersici* en los patógenos no productores de tomatinasas *Cladosporium fulvum* y *Nectria haematococca* mostraron una mayor tasa de esporulación durante la infección de plantas de tomate (Melton *et al.*, 1998; Sandrock y Vanetten, 2001), lo que demostró la implicación de este gen en virulencia. Además se ha descrito que las tomatinasas podrían jugar un papel importante en la supresión de resistencia a enfermedades de las plantas (Martín-Hernández *et al.*, 2000; Bouarab *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004), pudiendo ser expresadas por especies no patógenas de tomate en el interior de la planta (Lairini *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2005). Recientemente en un intento para interrumpir el gen tomatinasa en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se han conseguido transformantes con silenciamiento parcial del gen que muestran virulencia reducida, poniendo de manifiesto su papel en patogénesis (Ito *et al.*, 2002).

El objetivo de este capítulo ha sido estudiar el papel del gen *tom1* responsable de una tomatinasa (Roldán-Arjona *et al.*, 1999) en el comportamiento patotípico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. De esta forma, se han generado mutantes mediante interrupción dirigida que no expresan la enzima, y otros que la expresan de manera constitutiva. Nuestros resultados indican que la tomatinasa contribuye a la virulencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate.

2. Resultados

2.1. Interrupción dirigida del gen *tom1*

Para determinar la implicación del gen *tom1* en la patogénesis de *F. oxysporum*, se generaron estirpes mutantes portadoras de una copia del gen interrumpido mediante reemplazamiento génico. Para ello se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre con un fragmento de ADN lineal conteniendo una copia del gen interrumpido por el casete de resistencia a higromicina B (ver Materiales y Métodos). Se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se purificó el ADN genómico de los mismos. La comprobación del suceso de recombinación homóloga se realizó en primer lugar mediante PCR usando oligonucleótidos externos de la construcción (Tom1-3 + Tom1-8, Tabla 5). Así, se analizaron un total de 131 transformantes, de los cuales solo ocho mostraron bandas de amplificación del tamaño esperado que reemplazaba al alelo silvestre (Figura 10).

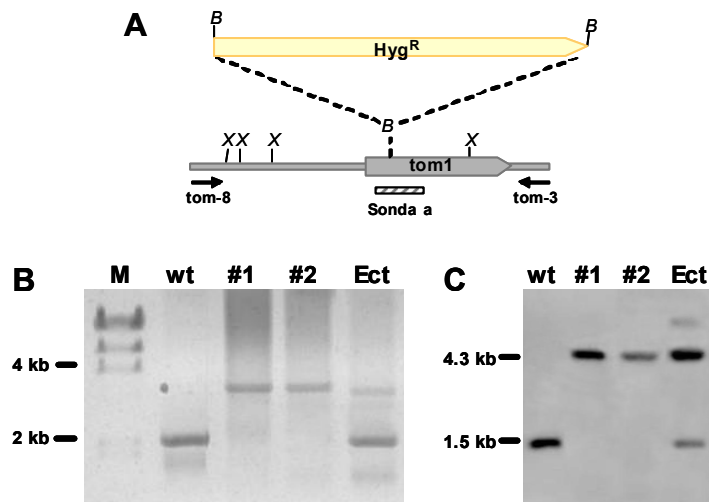


Figura 10. Interrupción dirigida del gen *tom1* de *F. oxysporum*. **A**, Mapa de restricción de la región genómica y del vector de disrupción. La región codificante se indica con la orientación de la fase abierta de lectura. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del vector de disrupción. El cassette de resistencia a higromicina (Hyg^R) se muestra con una flecha amarilla. Los sitios de restricción son: X = *XhoI*, y B = *BamHI*. **B**, Análisis mediante PCR del patrón de amplificación de *tom1* en las estirpes indicadas. **C**, Análisis *Southern* del ADN de las estirpes indicadas tratados con *XhoI* e hibridados con la sonda "a". wt = estirpe silvestre; #1 y #2 = transformantes por recombinación homóloga; Ect = transformante ectópico.

Posteriormente se confirmó la identidad de estos transformantes por recombinación homóloga mediante hibridación *Southern* del ADN tratado con la enzima *Xho*I, usando como sonda un fragmento interno de la región codificante del gen *tom1*. La estirpe silvestre mostró una banda de hibridación de 1.5 kb correspondiente al alelo silvestre de *tom1*, que fue reemplazada por una de 4.3 kb en los transformantes por recombinación homóloga. Los transformantes ectópicos mostraron la banda del alelo silvestre y otras adicionales correspondientes a inserciones ectópicas del alelo interrumpido (Figura 10).

2.2. Expresión constitutiva del gen *tom1*

Las estirpes portadoras de un alelo con expresión constitutiva de *tom1* (*tom1^C*) se obtuvieron mediante co-transformación de la estirpe silvestre con un fragmento conteniendo el casete de resistencia a fleomicina y otro fragmento conteniendo la región codificante del gen fusionado al promotor *PgpdA* responsable de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*, que confiere una transcripción fuerte y constitutiva (Punt *et al.*, 1990) (ver Materiales y Métodos).

Los transformantes se seleccionaron en medio suplementado con fleomicina. A continuación se purificó y analizó el ADN genómico de los ocho transformantes obtenidos.

La presencia del alelo constitutivo para el gen *tom1* se comprobó mediante hibridación *Southern* del ADN de algunos transformantes tratado con *Hind*III usando como sonda un fragmento interno de *tom1*, que mostró la presencia de una banda adicional correspondiente a la inserción ectópica del alelo constitutivo en estos transformantes (Figura 11).

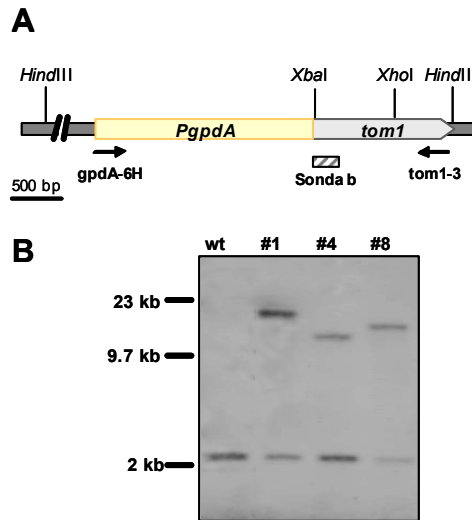


Figura 11. Expresión constitutiva del gen *tom1*. **A**, Mapa físico del vector utilizado. El gen *tom1* se muestra como una flecha gris fusionada al promotor *gpdA* de *A. nidulans*. Se indican las parejas de oligonucleótidos usados en la amplificación de la construcción. **B**, Análisis *Southern* de la estirpe silvestre (wt) y tres transformantes *tom1^C* obtenidos #1, #4 y #8. Los ADNs se trataron con *HindIII* y se hibridaron con la sonda indicada.

Para confirmar la ausencia de transcritos de *tom1* en los mutantes nulos $\Delta tom1\#1$ y $\#2$, y la sobreexpresión en el mutante constitutivo *tom1^C\#1* se llevó a cabo un análisis de hibridación *northern* (Figura 12). Para ello el ARN total de la estirpe silvestre, los mutantes $\Delta tom1\#1$ y $\#2$, y el mutante constitutivo *tom1^C\#1* obtenido tras 12 horas de crecimiento en PDB y posterior inducción durante 3 horas en medio CA con 30 $\mu\text{g/ml}$ de α -tomatina (Roldán-Arjona *et al.*, 1999) se hibridó con una sonda antisentido del gen *tom1* obtenida por amplificación con el cebador Tom1-16 (Tabla 5).

Los transcritos del gen fueron detectados en la estirpe silvestre solo en presencia de la saponina, mientras que no se observó hibridación en los mutantes nulos en ninguna condición. Por el contrario, en el mutante constitutivo *tom^C\#1* la transcripción del gen fue independiente de la presencia de tomatina en el medio de cultivo. El transformante con inserción ectópica del alelo interrumpido mostró idéntico patrón de hibridación que la estirpe silvestre.

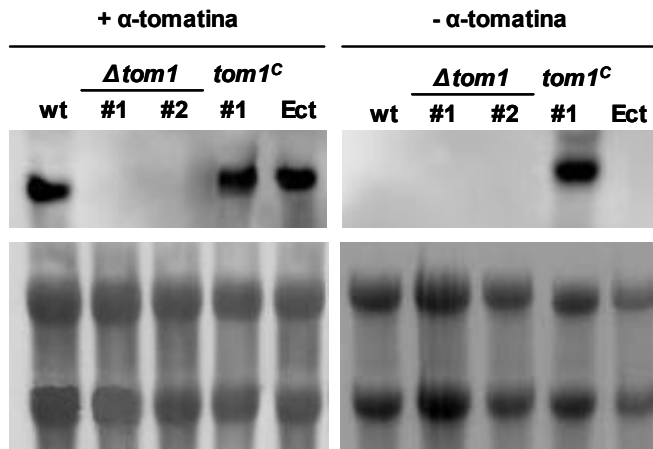


Figura 12. Análisis de expresión del gen *tom1*. Los paneles superiores indican las bandas de hibridación del ARN total en presencia (+) o en ausencia (-) de α -tomatina, usando una sonda antisentido del gen *tom1*. Los paneles inferiores muestran los mismos ARNs teñidos con azul de metileno. wt = estirpe silvestre; Ect = transformante ectópico.

2.3. Actividad tomatinasa

Se determinó el efecto de la interrupción dirigida y de la sobreexpresión del gen *tom1* sobre la actividad tomatinasa extracelular. Para ello se extrajeron las proteínas totales de filtrados de cultivos de las estirpes silvestre, $\Delta tom1$ y $tom1^C$ tras 48 horas en medio líquido CA en ausencia o presencia de α -tomatina. La actividad tomatinasa se analizó por ensayo espectrofotométrico a 525 nm de los azúcares reducidos utilizando como sustrato el ácido dinitrosalicílico (DNS). La estirpe silvestre mostró un incremento significativo en la actividad tomatinasa en condiciones de inducción, y ninguna actividad en ausencia de la saponina. En los mutantes nulos $\Delta tom1\#1$ y $\#2$ en presencia de α -tomatina se observó una reducción de aproximadamente el 25% en la actividad tomatinasa en comparación con la estirpe silvestre. Por el contrario, se detectaron niveles de actividad elevados en los extractos proteicos de los transformantes constitutivos $tom1^C\#1$ y $\#8$, independientemente de la presencia de la saponina en el medio de cultivo (Figura 13).

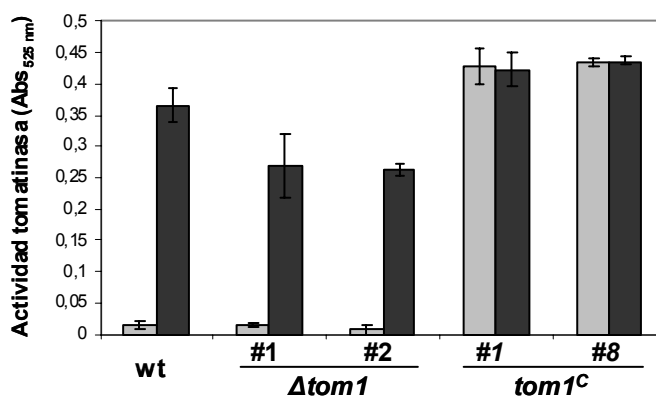


Figura 13. Actividad tomatinasa total producida en diferentes estirpes de *F. oxysporum* en ausencia (barras grises) o en presencia (barras negras) de α -tomatina. La actividad tomatinasa está expresada como la absorbancia a 525 nm de la mezcla de reacción. Cada columna representa la media de tres experimentos independientes, con indicación de las barras de error.

2.4. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de degradación de la α -tomatina

Los productos de la degradación de la α -tomatina producidos por extractos proteicos obtenidos de las diferentes estirpes fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 14). El análisis reveló que el filtrado del cultivo de la estirpe silvestre en presencia de la saponina causó la hidrólisis de la misma generando dos productos de degradación: uno mayoritario correspondiente a tomatidina, y otro minoritario que podría corresponder a la β_2 -tomatina. Este segundo producto fue el único obtenido a partir de extractos crudos del mutante $\Delta tom1$ en condiciones de inducción, lo que sugiere que en dicho mutante la α -tomatina se degrada a β_2 -tomatina. Por el contrario, la tomatidina es el único producto de degradación liberado a partir de extractos crudos del transformante constitutivo, tanto en presencia como en ausencia de α -tomatina, probablemente debido a que los altos niveles de tomatinasa producidos favorecen la degradación de α -tomatina a tomatidina.

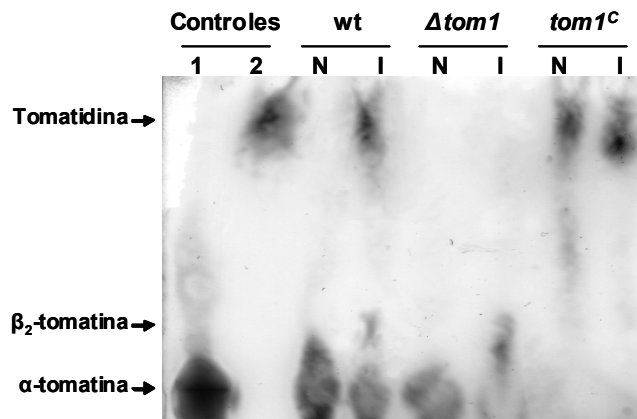


Figura 14. Análisis por cromatografía en capa fina de los productos de degradación generados por las tomatinasas. La solución conteniendo 5 mM de tomatina se incubó 14 horas a temperatura ambiente con extractos crudos de las estirpes silvestre (wt), mutante nulo y transformante constitutivo no inducidas (N) o inducidas (I). Los controles de α -tomatina y tomatidina se muestran en las líneas 1 y 2, respectivamente. El ensayo fue repetido dos veces con resultados similares. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

2.5. Sensibilidad de los mutantes a la α -tomatina

Se analizó la sensibilidad de los mutantes nulos y constitutivos a la α -tomatina en comparación con la estirpe silvestre mediante su crecimiento en medio sólido CA conteniendo 0.5 mM α -tomatina (Figura 15).

Tras 7 días de incubación a 28°C se midieron los diámetros de las colonias y de los halos que las rodeaban. No se encontraron diferencias en el crecimiento en ausencia de α -tomatina. Sin embargo, tanto la estirpe silvestre como el transformante constitutivo mostraron una inhibición de su crecimiento (GI) del 35% aproximadamente en presencia de 0.5 mM α -tomatina, en comparación con el crecimiento en ausencia de la misma. Los mutantes nulos mostraron un 50% de reducción del crecimiento en presencia de 0.5 mM de la saponina. La aparición de un halo traslúcido alrededor de las colonias en presencia de α -tomatina podría ser consecuencia de su hidrólisis. La razón diámetro del halo/diámetro de la colonia fue similar en las estirpes silvestre y mutante nulo, a pesar del menor crecimiento observado en los transformantes $\Delta tom1$. Por el contrario, este valor fue más alto en los transformantes constitutivos.

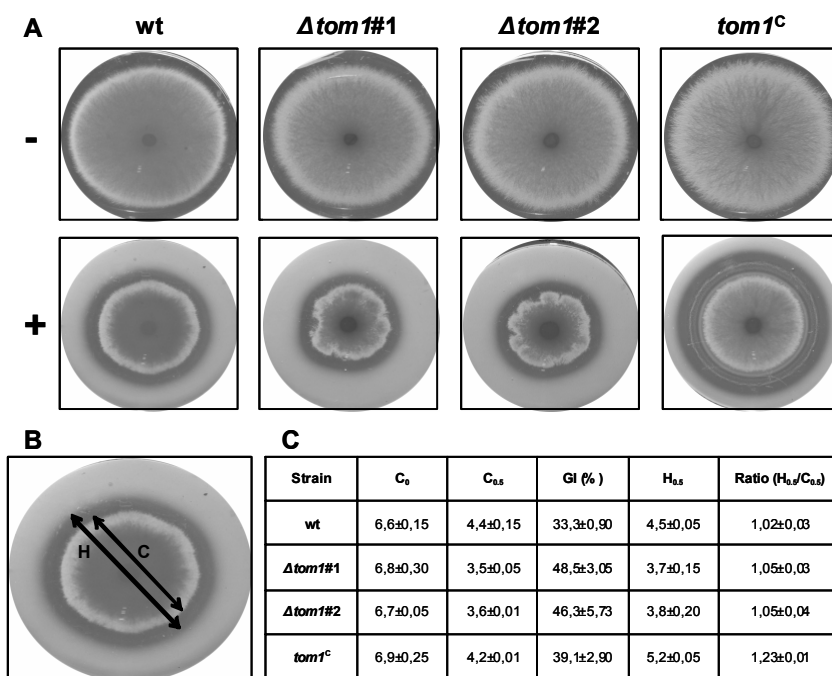


Figura 15. Efecto de la α -tomatina sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. **A**, Crecimiento de las estirpes en medio sólido en ausencia (-) o presencia (+) de 0.5 mM de α -tomatina tras 7 días. **B**, Diámetro de las colonias en 0.5 mM de α -tomatina (C) y del halo que las rodean (H). **C**, Medida del diámetro de la colonia (cm) en ausencia de α -tomatina (C_0), en presencia de 0.5 mM de α -tomatina ($C_{0.5}$), y de los halos que las rodean ($H_{0.5}$). La inhibición del crecimiento (GI) indica el porcentaje de inhibición del crecimiento para cada estirpe (valores de $C_{0.5}$ comparados con C_0). La razón ($H_{0.5}/C_{0.5}$) representa la relación entre los tamaños observados del halo y de la colonia, para cada estirpe en presencia de α -tomatina.

2.6. Comportamiento patotípico de los mutantes *tom1*

Para determinar el papel del gen tomatinasa en la patogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate con los mutantes obtenidos en este trabajo (Figura 16).

Las raíces de plántulas de tomate del cultivar Monika con 14 días de edad se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión de 5×10^6 esporas/ml de la estirpe silvestre, de los mutantes nulos $\Delta tom1\#1$ y $\#2$ o de los transformantes constitutivos $tom1^C\#1$ y $\#8$. A continuación, se sembraron en vermiculita y se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante las 2-3

semanas posteriores. La escala del índice de enfermedad utilizada varía de 1 a 5, siendo 1 planta sana y 5 planta muerta (Huertas-González *et al.*, 1999).

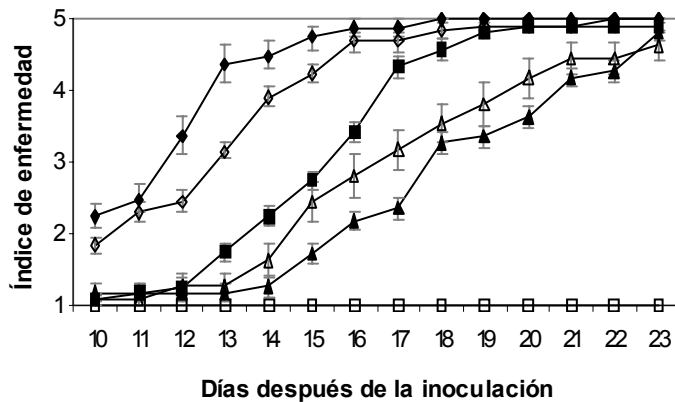


Figura 16. Virulencia de las estirpes de *F. oxysporum* sobre plantas de tomate (cv. Monika). La severidad de los síntomas de enfermedad fue anotada durante varios días después de la inoculación, usando un índice que varía de 1 (planta sana) a 5 (planta muerta). Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre (■), el transformante $\Delta tom1\#1$ (Δ), el transformante $\Delta tom1\#2$ (\blacktriangle), el transformante $tom1^C\#1$ (\diamond), el transformante $tom1^C\#8$ (\blacklozenge), y el control sin inocular (\square). Las barras de error indican el error estándar de 15 plantas por cada experimento.

La severidad de los síntomas de enfermedad en plantas inoculadas con la estirpe silvestre aumentó a lo largo del experimento, estando la mayoría de las plantas muertas 20 días después de la inoculación. Las plantas inoculadas con los mutantes nulos mostraron un retraso significativo en el desarrollo de los síntomas de enfermedad en comparación con la estirpe silvestre, estando la mayoría de las plantas muertas 25 días después de la inoculación. Por el contrario, los transformantes constitutivos mostraron un aumento significativo en la progresión de la enfermedad, resultando muertas las plantas 15 días después de la inoculación.

2.7. Identificación de nuevos genes tomatinasa en el genoma de *F. oxysporum*

Para investigar la existencia de genes tomatinasa adicionales se realizó una búsqueda *in silico* en el genoma de *F. oxysporum* (www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group). Se identificaron

al menos cuatro genes responsables de proteínas con posible actividad tomatinasa, que mostraron una elevada identidad a la β -tomatinasa de *S. lycopersici* y a la avenacinasa de *G. graminis* (Durbin y Uchtyl, 1969; Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995) (Figura 17).

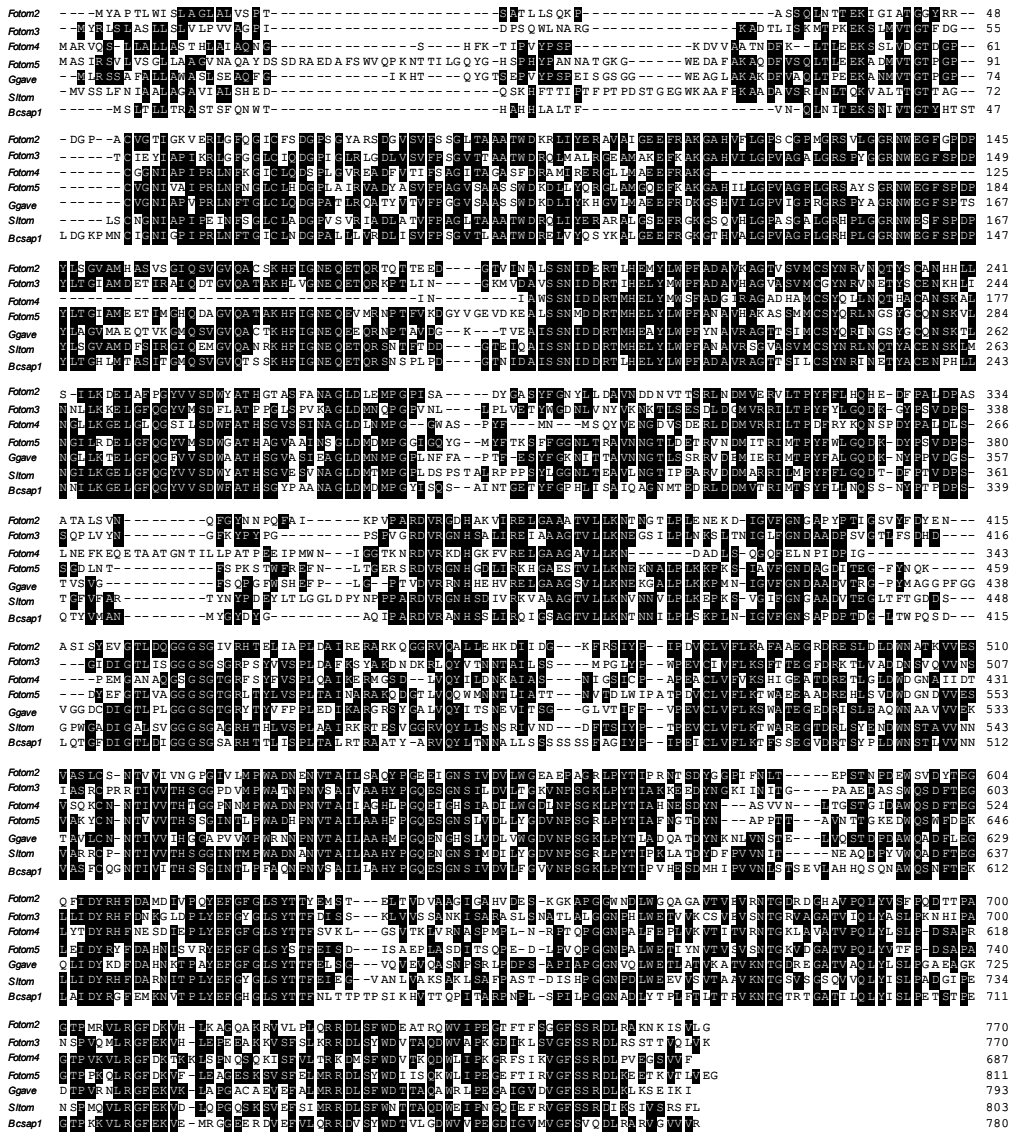


Figura 17. Alineamiento mediante el método ClustalW de la secuencia aminoácida de las proteínas deducidas de los nuevos genes tomatinasas de *F. oxysporum tom2*, *tom3*, *tom4* y *tom5*, y las saponinas Ave (AAA63146) de *G. graminis*, Tom (AAB08446) de *S. lycopersici* y Sap1 (CAB61489) de *B. cinerea*.

Los genes identificados en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fueron nombrados *tom2* (FOXG_09849), *tom3*, (FOXG_02734), *tom4* (FOXG_13018) y *tom5* (FOXG_09125). Las secuencias de aminoácidos deducidas de estos genes presentaron un alto grado de identidad con las proteínas pertenecientes a la familia 3 de glicosil hidrolasas: 51.8% entre *tom2* y la avenacinasa *sap1* de *B. cinerea*, 53.5% entre *tom3* y la tomatinasa de *S. lycopersici*, 50.0% entre *tom4* y la avenacinasa de *G. graminis*, y 56.8% entre *tom5* y la avenacinasa de *G. graminis*.

Para establecer la relación filogenética entre estas proteínas, la secuencia de aminoácidos de las tomatinasas de *F. oxysporum* fueron alineadas con la β_2 -tomatinasa de *S. lycopersici* (Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995), la avenacinasa de *G. graminis* (Bowyer *et al.*, 1995), la avenacinasa Sap1 de *B. cinerea* (Quidde *et al.*, 1999), una proteína de la familia de glicosil hidrolasas de *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005), una tomatinasa de *Streptomyces turgidiscabies* (Kers *et al.*, 2005), y otra de *Clavibacter michiganensis* (Kaup *et al.*, 2005).

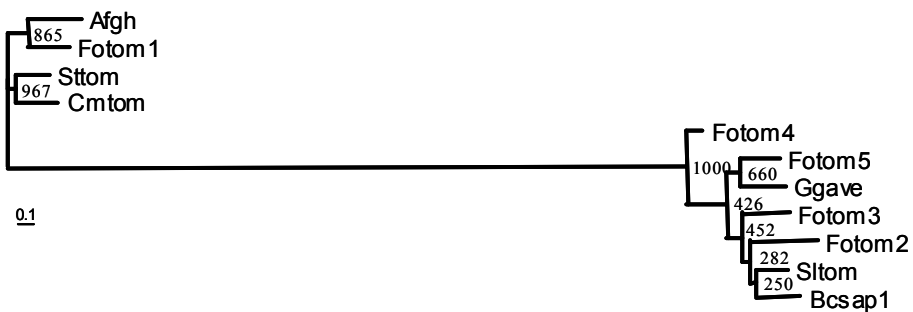


Figura 18. Relaciones filogenéticas entre las tomatinasas de *F. oxysporum*. El filograma fue obtenido con el método de máxima verosimilitud de las tomatinasas de *F. oxysporum* Tom1, Tom2, Tom3, Tom4 y Tom5; una β_2 -tomatinasa de *Septoria lycopersici* (Sltom) (AAB08446); la avenacinasa de *G. graminis* (Ggave) (AAA63146); una tomatinasa de *Streptomyces turgidiscabies* (Sttom) (AAW49296); una tomatinasa de *Clavibacter michiganensis* (Cmtom) (YP_001220829); una proteína glicosil hidrolasa de *A. fumigatus* (AfgH) (XP_751064) y la avenacinasa de *B. cinerea* (Bcsap1) (CAB61489). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas usando el método ClustalW. Los números en los puntos de ramificación representan el valor de "bootstrap" basado en 1000 repeticiones de ensamblaje al azar. Una barra indica la distancia genética (sustituciones por base).

El árbol filogenético resultante demostró que las tomatinasas de *F. oxysporum* se agrupan en dos bloques: Tom1 pertenece a la familia 10 de glicosil hidrolasas, mientras que Tom2, Tom3, Tom4 y Tom5 son miembros de la familia 3 de glicosil hidrolasas (Figura 18).

Posteriormente, se analizó la expresión de estos nuevos genes mediante RT-PCR a tiempo final, usando parejas de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 5), en las estirpes silvestre, $\Delta tom1$ y $tom1^C$, en ausencia o presencia de α -tomatina (Figura 19). Para discriminar los amplicones obtenidos a partir del ADN genómico, las parejas de cebadores fueron diseñadas dentro de exones, con la excepción de la pareja de oligonucleótidos del gen $tom1$, que carece de intrones.

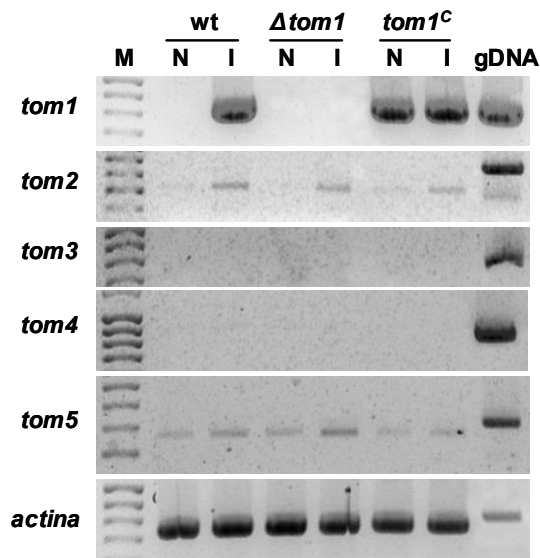


Figura 19. Análisis de expresión de los genes $tom1$, $tom2$, $tom3$, $tom4$ y $tom5$ por RT-PCR a tiempo final en las diferentes estirpes crecidas en ausencia (N) o en presencia (I) de α -tomatina. El gen actina fue usado como control interno. La amplificación de los ADNs genómicos se utilizó como control positivo de la PCR.

Los resultados obtenidos indican bajos niveles de expresión en los genes $tom2$ y $tom5$ en comparación con $tom1$, mientras que no se detectó la expresión de $tom3$ y $tom4$ en ninguna condición analizada. La expresión de $tom2$ parece estar inducida por la saponina, mientras que $tom5$ es independiente de la presencia de α -tomatina en el medio de cultivo. La

inactivación o la sobreexpresión de *tom1* no alteró el patrón de expresión de los otros genes tomatinasas. El patrón de expresión de *tom1*, también incluido en este estudio, fue coincidente al observado en el análisis northern.

3. Discusión

El proceso de infección de los hongos fitopatógenos requiere la confrontación entre dos mecanismos diferentes: el ataque del patógeno y la respuesta de defensa de la planta. Entre las defensas desarrolladas por la planta de tomate se encuentra la producción de la saponina α -tomatina, que es detoxificada por una enzima tomatinasa secretada por el patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lairini *et al.*, 1996). Esta proteína, determinada por el gen *tom1*, degrada la molécula generando tomatidina y el tetrasacárido β -licotetraosa (Lairini *et al.*, 1996; Roldán-Arjona *et al.*, 1999).

Se piensa que la detoxificación de las saponinas de plantas puede ser un determinante de la virulencia para los hongos patógenos, por lo que se han realizado numerosos esfuerzos para establecer la importancia de las saponinasas en la patogénesis. En un intento para interrumpir el gen *tom1* de *F. oxysporum*, Ito y colaboradores (2002) aislaron transformantes que mostraron un silenciamiento parcial de su expresión, y que resultaron tener una virulencia reducida en plantas de tomate (Ito *et al.*, 2002). Sin embargo, los mismos autores no pudieron concluir el papel esencial de *tom1* en patogénesis. En este trabajo hemos analizado los efectos de la interrupción dirigida y la sobreexpresión del gen *tom1* en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mediante la construcción de los mutantes adecuados.

El análisis de expresión northern del mutante constitutivo *tom1^C* reveló la presencia de transcritos *tom1* en condiciones inductoras y no inductoras, confirmando la sobreexpresión de este gen. De acuerdo con esto, la actividad tomatinasa en los mutantes *tom1^C* fue independiente de la presencia de α -tomatina en el medio de cultivo. Por el contrario, los transcritos de *tom1* no se detectaron en los mutantes Δ *tom1* en presencia de la saponina, lo que confirmó la inactivación del gen *tom1*. Sin embargo, el

nivel de actividad tomatinasa total en los mutantes sólo se redujo un 25% en comparación con la estirpe silvestre.

Una caracterización más exhaustiva de los transformantes $\Delta tom1$ y $tom1^C$ reveló una mayor inhibición del crecimiento de los mutantes nulos en medio sólido conteniendo α -tomatina, mientras que no se observaron diferencias entre los transformantes constitutivos y la estirpe silvestre. Estos resultados indican mayor sensibilidad de los mutantes $\Delta tom1$ a la saponina debido a la reducción en su actividad tomatinasa total. Sin embargo, los halos de degradación circundantes a las colonias fueron comparables en los mutantes $\Delta tom1$ y la estirpe silvestre cuando fueron crecidos en presencia de elevadas concentraciones de la saponina, mientras que los halos de degradación en los transformantes constitutivos $tom1^C$ fueron significativamente más grandes, lo que sugiere una actividad hidrolítica más fuerte en estos transformantes como consecuencia de la sobreexpresión del gen $tom1$.

Los ensayos de patogenicidad sobre plantas de tomate indicaron que la interrupción del gen $tom1$ produce un retraso en la progresión de los síntomas de enfermedad, mientras que la sobreexpresión de $tom1$ resulta en un desarrollo más rápido de la misma. Estos resultados sugieren que, aunque el producto de $tom1$ no es un factor esencial para la patogénesis, sí contribuye a la virulencia completa de *F. oxysporum* sobre plantas de tomate.

Todas estas observaciones: la elevada actividad tomatinasa en los mutantes $\Delta tom1$, la semejanza en el halo de degradación producido por los mutantes nulos y la estirpe silvestre, y la virulencia reducida de estos mutantes; sugieren la existencia de actividades enzimáticas adicionales en *F. oxysporum* que podrían contribuir a la detoxificación de la α -tomatina con funciones redundantes. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* reveló la existencia de al menos cinco genes responsables de proteínas tomatinasas: el gen $tom1$, que detoxifica la molécula hasta tomatidina y β -licotetraosa y pertenece a la familia 10 de glicosil hidrolasas (Roldán-Arjona *et al.*, 1999), y cuatro genes adicionales con identidades al gen avenacinasa

de *G. graminis* y al gen β_2 -tomatinasa de *S. lycopersici*, ambos pertenecientes a la familia 3 de glicosil hidrolasas (Henrissat y Bairoch, 1993; Osbourn *et al.*, 1995). Es lógico considerar que las proteínas determinadas por estos cuatro genes adicionales podrían ser las responsables de la actividad tomatinasa y de los halos de degradación producidos por los mutantes $\Delta tom1$, a pesar del bajo nivel de expresión general de estos genes. Esta hipótesis concuerda además con los resultados obtenidos en el análisis TLC de los productos de degradación de la α -tomatina liberados por extractos crudos de los mutantes $\Delta tom1$ inducidos, donde la β_2 -tomatina fue el único producto detectado, confirmando la hidrólisis del compuesto por enzimas adicionales con un mecanismo de acción diferente al de Tom1.

La existencia de varios genes adicionales responsables de enzimas tomatinasas ha sido propuesta previamente en el patógeno de tomate *Colletotrichum coccodes* (Sandrock y Vanetten, 2001), donde mutantes que carecen de una copia funcional de un gen β_2 -tomatinasa son capaces de degradar la α -tomatina a tomatidina. En el patógeno *B. cinerea* se han descrito al menos tres actividades diferentes de degradación de saponinas: Sap1, que detoxifica la avenacina, otra que es activa sobre digitonina y sobre α -tomatina, y una tercera considerada una avenacosidasa (Quidde *et al.*, 1999). La existencia de al menos cinco genes tomatinasas en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* confirma que la detoxificación de la α -tomatina juega un importante papel durante la infección de plantas de tomate. En *S. lycopersici*, mutantes deficientes en un gen β_2 -tomatinasa no mostraron cambios en la capacidad de patogénesis (Martín-Hernández *et al.*, 2000). Los autores de este trabajo propusieron la existencia de mecanismos adicionales de resistencia a la α -tomatina no degradativos, ya que no se detectaron otros productos de hidrólisis de la saponina en los mutantes deficientes en dicho gen. Recientemente, se han inactivado genes ortólogos a *tom1* de *F. oxysporum* en el actinomiceto patógeno de tomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gen *tomA*) y en la bacteria fitopatógena *Streptomyces turgidiscabies*, aunque los mutantes no resultaron con virulencia reducida (Kaup *et al.*, 2005; Kers *et al.*, 2005). Por el contrario, la disrupción del gen codificante de la avenacinasa en el patógeno de cereales *G. graminis* var.

avenae reveló que la detoxificación de la avenacina A-1 es un factor determinante de la especificidad de hospedador (Bowyer *et al.*, 1995; Osbourn *et al.*, 1994). Un papel similar ha sido propuesto para las tomatinasas de *B. cinerea* y *Corynespora cassiicola*, en los que mutantes carentes de los correspondientes genes tomatinasas resultaron no patógenos (Oka *et al.*, 2006; Quidde *et al.*, 1998). Por otro lado, la expresión heteróloga del gen de la β_2 -tomatinasa de *S. lycopersici* en estirpes de *N. haematococca* y *Cladosporium fulvum* incapaces *per se* de degradar la α -tomatina resultó en la adquisición de la capacidad para infectar frutos de tomate verdes y en un incremento en la esporulación y extensión de la infección en cotiledones, respectivamente (Melton *et al.*, 1998; Sandrock y Vanetten, 2001).

En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, la detoxificación de la α -tomatina juega un papel esencial durante la infección de plantas de tomate, probablemente como resultado de la acción combinada de diferentes actividades tomatinasas.

Capítulo 2

**Bases moleculares de la avirulencia del
mutante $\Delta chsV$ de *F. oxysporum*, deficiente
en la síntesis de quitina**

1. Introducción

Durante el proceso de infección de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate se producen interacciones moleculares entre ambas especies, que dan lugar al comienzo del ciclo infectivo del hongo y a la activación del mecanismo de defensa de la planta. En este escenario, la pared celular fúngica juega un importante papel: por un lado, proporciona la rigidez necesaria para que las hifas del hongo penetren las células vegetales, a la vez que actúa como un primer sistema de defensa fúngico frente a los compuestos antimicrobianos de las plantas; y por otro, es un componente a partir del cual se generan muchos de los compuestos elicitores de la respuesta de defensa de la planta.

La pared celular fúngica está constituida por una red tridimensional de polisacáridos (glucano y quitina) y proteínas mayoritariamente glicosiladas (Bowman y Free, 2006) (Figura 20). La quitina es un homopolímero microfibrilar de N-acetilglucosamina (NAGlc) unido por enlaces β -1,4 (Bartnicki-García, 1968), presente en la pared celular de hongos y en la cutícula de los insectos, y ausente en el reino vegetal. En la pared celular de hongos filamentosos la quitina se distribuye formando una fina capa cercana a la membrana plasmática, y su contenido en peso seco total alcanza hasta el 30%. El glucano es el componente estructural mayoritario de las paredes fúngicas, constituyendo el 50-60% de su peso seco. Está compuesto por residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3 (más abundantes) o β -1,6, dando lugar a los distintos tipos de glucano. Los polisacáridos de la pared celular constituyen la base estructural, sobre la que se anclan las proteínas que forman parte de la misma. El β -1,3-glucano es la estructura principal a la que se unen los otros componentes de la pared, mientras que el β -1,6-glucano conecta las proteínas con el esqueleto formado por el β -1,3-glucano y la quitina (Kollar *et al.*, 1997).

Las proteínas de pared desempeñan diversas funciones, entre las que se encuentran la síntesis y remodelación de la propia pared, la formación

de enlaces que unan los componentes de la misma, la adhesión o la fusión de hifas (Bowman y Free, 2006). Estas proteínas pueden encontrarse inmersas en la red de polisacáridos, o bien formando una capa externa, compuesta por proteínas modificadas mediante N- u O-glicosilación (glicoproteínas). En ambos casos las proteínas se encuentran unidas a los polisacáridos de la pared celular.

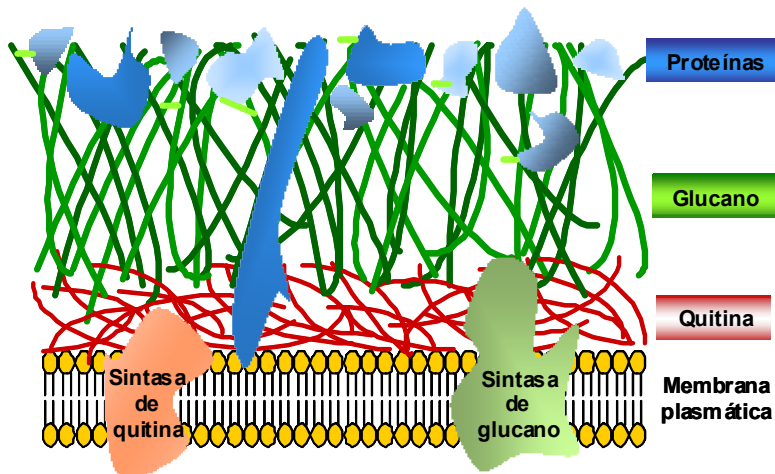


Figura 20. Esquema de la pared fúngica.

La pared celular de *F. oxysporum* (Figura 21) tiene un grosor de 70 nm y consiste en dos capas (Schoffemeer *et al.*, 1999): una externa, densa a los electrones, enriquecida en glicoproteínas, cuyas cadenas contienen ácidos urónicos, manosa, galactosa y glucosa; y una interna, transparente a los electrones, compuesta por el entramado de los polisacáridos glucano (β -1,3-, β -1,6- y α -1,3-) y quitina. Debajo de esta última se encuentra la membrana plasmática y las proteínas periplásmicas adyacentes que forman también una capa densa a los electrones.

Para que la pared celular fúngica desempeñe todas sus funciones es necesario que se estén produciendo cambios continuos en su estructura y composición. Esto requiere la acción coordinada de numerosas enzimas que se encarguen de la síntesis de nueva pared (sintasas de glucano y quitina), de la estabilización de la misma (enzimas que establecen enlaces cruzados

entre los componentes de la pared), y de la remodelación para permitir el crecimiento del hongo (enzimas líticas como glucanasas y quitinasas).

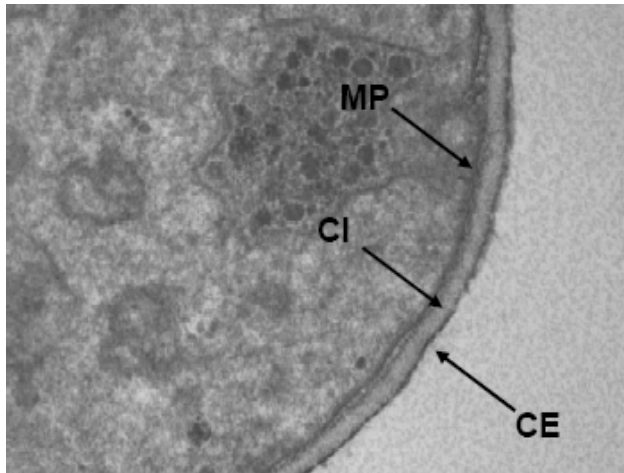


Figura 21. Micrografía electrónica de la pared celular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. MP = membrana plasmática; CI = capa interna de la pared celular; CE = capa externa de la pared celular.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que ponen de manifiesto la importancia de la estructura y la composición de la pared fúngica en la patogénesis fúngica. De hecho, la interrupción de algunos genes involucrados en la síntesis y el mantenimiento de las paredes celulares fúngicas ha originado estirpes no patógenas (Soulie *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2007). En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se ha investigado en profundidad el papel que desempeñan los genes sintasas de quitina (*chs*) en la patogénesis, y se han aislado varios mutantes con alteraciones en la virulencia (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; 2008). El primer mutante aislado en *F. oxysporum* deficiente en una de estas enzimas fue el mutante $\Delta chsV$ (Madrid *et al.*, 2003), que carece de un gen sintasa de quitina de clase V fundamental para la patogénesis en plantas de tomate. Además, este mutante muestra alteraciones en su pared celular (Figura 22), como un engrosamiento anormal de la misma, estructuras globulares en las hifas y una distribución anormal de núcleos (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; 2008).

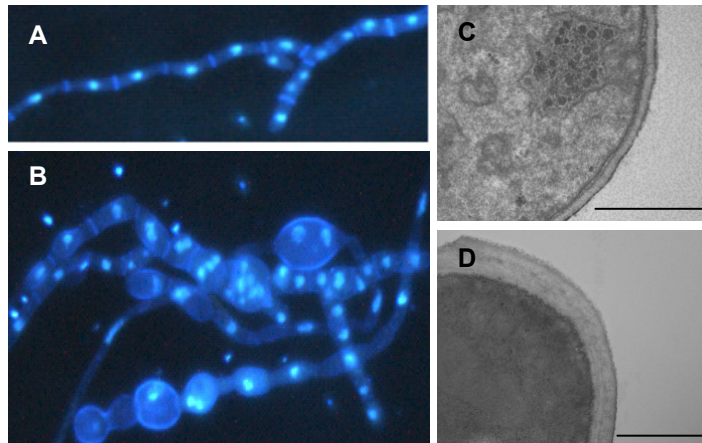


Figura 22. Comparación de la morfología y la pared celular de la estirpe silvestre (a y c) y del mutante $\Delta chsV$ (b y d). **A** y **B**, Imágenes de microscopía de fluorescencia de germínulas de 14 horas crecidas en PDB y teñidas con CFW y DAPI, con un aumento de 200x. **C** y **D**, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la pared celular. Barras, 1 μm . (Martín-Urdíroz et al., 2004; 2008).

A pesar de que este mutante $\Delta chsV$ no causa enfermedad en las plantas de tomate, sí se ha demostrado que es capaz de invadir la raíz y colonizar los tejidos internos de la misma (Figura 23) (Martín-Urdíroz, Tesis Doctoral, 2008).

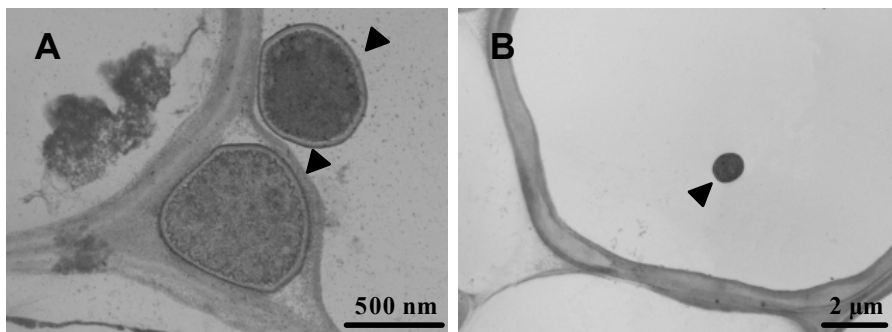


Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de raíces de plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$. Las hifas fueron localizadas en el córtex (A) y en el sistema vascular (B). (Martín-Urdíroz, Tesis Doctoral, 2008).

En este trabajo se ha estudiado si, como consecuencia de la alteración en la pared fúngica, este mutante es capaz de elicitar rápidamente la respuesta de defensa de la planta, lo que resultaría en una restricción de la colonización del hongo, que evitaría el desarrollo de la enfermedad.

2. Resultados

2.1. Co-inoculación de plantas de tomate con la estirpe silvestre y el mutante no patógeno $\Delta chsV$ de *F. oxysporum*

Para determinar si el mutante $\Delta chsV$ puede elicitar la respuesta de defensa de la planta, favoreciendo que ésta se defienda más intensamente, se llevaron a cabo experimentos de co-inoculación de plantas de tomate con esporas de las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$ simultáneamente. Si el mutante no patógeno indujera la defensa en la planta, ésta podría quedar protegida de la enfermedad, provocada por el silvestre, durante la co-inoculación con ambas estirpes. Para ello se sumergieron las raíces de plántulas de tomate en suspensiones de microconidias de las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$, mezcladas a diferentes concentraciones (Figura 24). A continuación, se sembraron en vermiculita y se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante las 2-3 semanas posteriores. La escala del índice de enfermedad utilizada varía de 1 a 5, siendo 1 planta sana y 5 planta muerta (Huertas-González *et al.*, 1999).

La severidad de los síntomas de marchitez en plantas inoculadas con la estirpe silvestre, a las concentraciones 1x (5×10^6 esporas/ml), 0.5x (2.5×10^6 esporas/ml) o 0.1x (5×10^5 esporas/ml) aumentó a lo largo del experimento, de forma que la mayoría de las plantas habían muerto 25 días después de la inoculación (Figura 24). Por el contrario, se observó un retraso significativo en el desarrollo de los síntomas de enfermedad en las plantas co-inoculadas con distintas proporciones del inóculo conteniendo, al menos, doble cantidad de esporas del mutante que del silvestre. La máxima reducción en el índice de enfermedad se observó utilizando la proporción 0.1 silvestre : 1 mutante $\Delta chsV$. Las plantas inoculadas solo con esporas del mutante no mostraron síntomas de enfermedad.

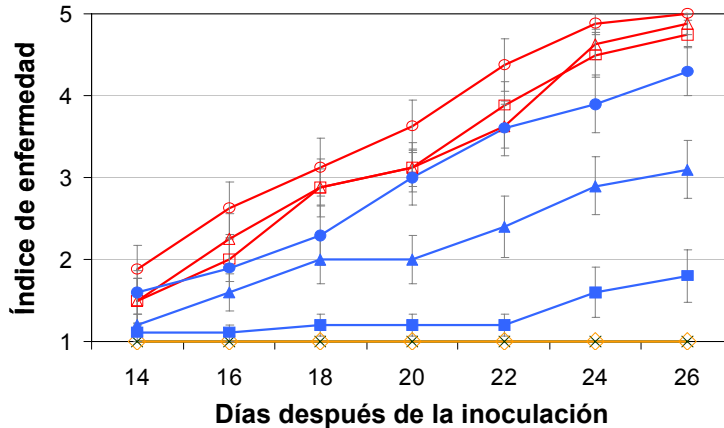


Figura 24. Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate inoculadas con la estirpe silvestre, el mutante $\Delta chsV$, o ambas estirpes simultáneamente a diferentes combinaciones. La severidad de los síntomas de enfermedad fue evaluada durante las 2-3 semanas posteriores a la inoculación, usando un índice que varía entre 1 (planta sana) y 5 (planta muerta). Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre sola (rojo) a las concentraciones 0.1x (□), 0.5x (Δ), y 1x (○); el mutante $\Delta chsV$ solo (naranja) a concentración 1x (◇); diferentes combinaciones de la estirpe silvestre y el mutante (azul) a las concentraciones 0.1x:1x (■), 0.5x:1x (▲), y 1x:0.5x (●), respectivamente; y el control de plantas no infectadas (x). Las barras de error indican el error estándar de 15 plantas por tratamiento.

Para estudiar si el efecto protector observado en el mutante $\Delta chsV$ es específico de esta estirpe se realizaron experimentos de co-inoculación de plantas de tomate utilizando la estirpe silvestre junto con esporas del mutante no patógeno $\Delta fmk1$, deficiente en un gen que codifica una proteína MAP quinasa (Di Pietro *et al.*, 2001a), o del mutante con virulencia muy reducida $\Delta gas1$, que carece de una enzima β -1,3- glucanosiltransferasa (Caracuel *et al.*, 2005), en proporción 0.1x:1x respectivamente (Figura 25).

No se observó un retraso significativo en el desarrollo de los síntomas de enfermedad en ningún caso en plantas co-inoculadas con el silvestre y cualquiera de los mutantes $\Delta fmk1$ o $\Delta gas1$ (Figura 25), lo que confirma la especificidad del efecto protector ejercido por el mutante $\Delta chsV$.

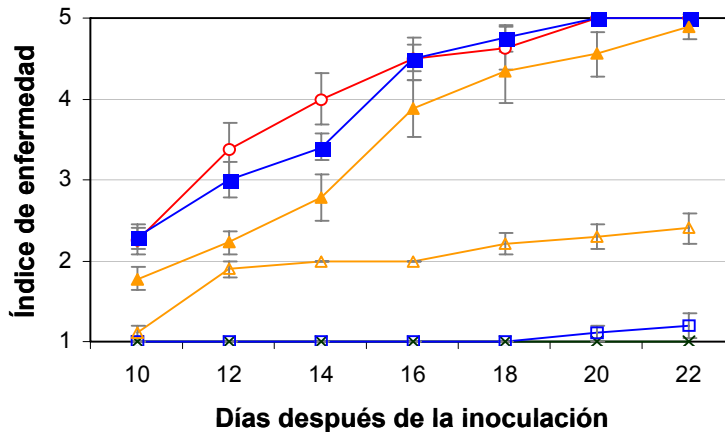


Figura 25. Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate co-inoculadas con la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta fmk1$ o $\Delta gas1$ a concentración 0.1x:1x respectivamente. La severidad de los síntomas de enfermedad fue evaluada durante las 2-3 semanas posteriores a la inoculación, usando un índice que varía entre 1 (planta sana) y 5 (planta muerta). Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre (rojo) a la concentración 0.1x (○); el mutante $\Delta fmk1$ (azul) a concentración 1x solo (□) o en co-infección con la estirpe silvestre (■); el mutante $\Delta gas1$ (naranja) a concentración 1x solo (Δ) o en co-infección con la estirpe silvestre (▲); y el control de plantas no infectadas (x). Las barras de error indican el error estándar de 15 plantas por tratamiento.

Para analizar si la fuerte reducción en la progresión de los síntomas de enfermedad durante la co-infección con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ a concentración 0.1x:1x, respectivamente, se debe a la competencia entre ambos por los sitios de infección, se llevaron a cabo ensayos de inoculación secuencial. En ellos, las raíces de las plantas de tomate fueron sumergidas primero en una suspensión de microconidias de la estirpe silvestre a concentración 0.1x durante 15 minutos, y después en una suspensión de esporas del mutante $\Delta chsV$, a concentración 1x durante otros 15 minutos. De esta forma se permitió a la estirpe silvestre adherirse a las raíces sin interferencia física con el mutante no patógeno (Figura 26).

No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en este ensayo y los observados durante la co-inoculación simultánea de ambas estirpes a la concentración 0.1x:1x (wt: $\Delta chsV$) durante 30 minutos. En ambos casos se observó un retraso significativo en la progresión de la enfermedad (Figura 26). Además, no se observaron diferencias en la severidad de los síntomas entre plantas inoculadas con la

estirpe silvestre a concentración 0.1x durante 15 minutos (Figura 26) y a concentración 1x durante 30 minutos (Figura 24). Esto demuestra que el mutante $\Delta chsV$ ejerce un efecto protector en plantas de tomate aunque la estirpe silvestre patógena se haya adherido previamente a la superficie radicular.

Todos los ensayos de patogénesis fueron repetidos al menos 3 veces con resultados similares.

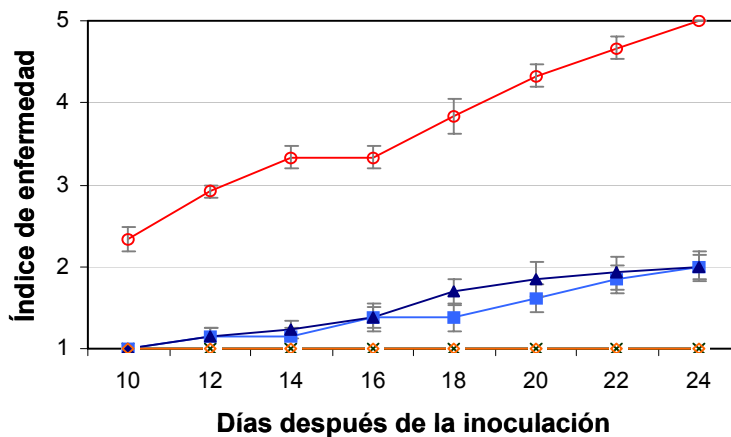


Figura 26. Progresión de los síntomas de enfermedad en plantas de tomate inoculadas secuencialmente con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ a concentración 0.1x:1x respectivamente. Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre sola (rojo) a la concentración 0.1x durante 15 minutos (\circ); el mutante $\Delta chsV$ (naranja) solo a concentración 1x durante 30 minutos (\diamond); las co-infecciones con la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ a concentración 0.1x:1x respectivamente (azul), con ambas estirpes simultáneamente durante 30 minutos (\blacktriangle) o secuencialmente con 15 minutos de la estirpe silvestre seguidos de 15 minutos con el mutante $\Delta chsV$ (\blacksquare); y el control de plantas no infectadas (x). Las barras de error indican el error estándar de 15 plantas por tratamiento.

2.2. Cuantificación de la biomasa fúngica en plantas infectadas con las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$

Para estimar el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante $\Delta chsV$ en el interior de plantas de tomate se llevaron a cabo experimentos de cuantificación del ADN genómico fúngico, presente en tallos de plantas infectadas, mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se realizaron cultivos hidropónicos en los que se sumergieron raíces de plantas de tomate

en suspensiones de microconidias del silvestre y/o del mutante $\Delta chsV$ a concentración 0.1x o 1x. Estos cultivos se mantuvieron en agitación suave y 28 °C durante 3, 5 o 7 días, tras los cuales los tallos fueron separados del resto de la planta y utilizados para la extracción del ADN genómico total, usado posteriormente como molde en las reacciones de amplificación. Se emplearon sólo tejidos del tallo de plantas infectadas para evitar la amplificación del ADN genómico fúngico de hifas que no hubieran penetrado la planta pero que estuvieran adheridas a la raíz.

En primer lugar se comparó el crecimiento en el interior de las plantas de cada estirpe por separado a concentración 1x. Se utilizó una pareja de cebadores específica para la amplificación de ADN fúngico (Act-2 y Act-q6, tabla 4), que amplifica un fragmento de 477 pb del gen actina del hongo. La curva estándar a partir de la cual se calculó la concentración de ADN fúngico se muestra en la Figura 27. El incremento de Ct calculado a partir de la ecuación obtenida fue 1.035, lo que indica una alta eficiencia en la reacción de PCR.

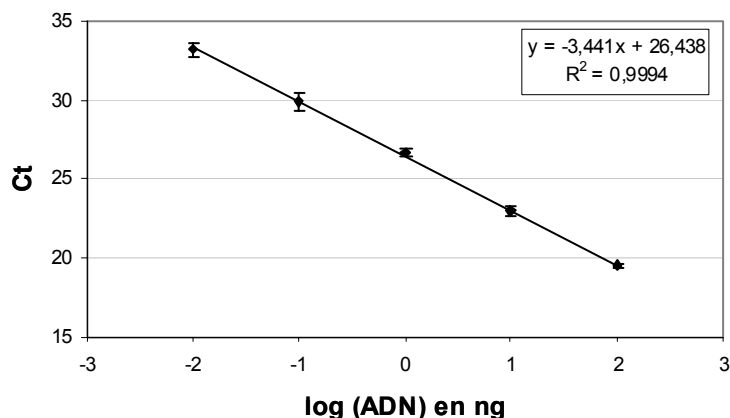


Figura 27. Curva estándar obtenida al representar el logaritmo de concentraciones conocidas de ADN de *Fusarium* (100 – 0.01 ng) frente a los valores de Ct obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real. Esta curva fue utilizada para calcular la cantidad de ADN de cada estirpe del total de ADN genómico extraído de tallos de plantas infectadas. Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados de cuantificación del ADN fúngico en el interior de plantas infectadas con la estirpe silvestre o el mutante $\Delta chsV$ por separado a

concentración 1x (Figura 28) muestran que la cantidad de biomasa fúngica aumenta a lo largo del curso de la infección en plantas inoculadas con la estirpe silvestre, obteniéndose el nivel más alto 7 días tras la inoculación. Por otro lado, la cantidad de biomasa fúngica del mutante disminuyó a lo largo del curso de la infección, obteniéndose el nivel más alto a los 3 días después de la inoculación. Estos datos indican que el mutante $\Delta chsV$ alcanza el tallo de la planta con mayor rapidez que la estirpe silvestre, pero sin embargo, su crecimiento va quedando restringido a lo largo del curso de la infección.

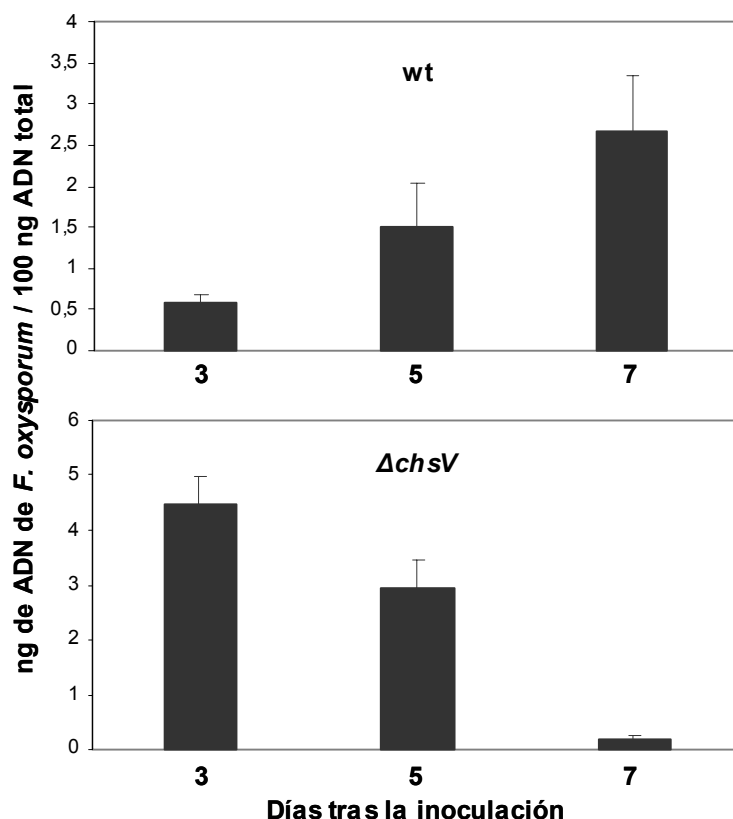


Figura 28. Cuantificación *in planta* del ADN de *Fusarium* 3, 5 y 7 días después de la inoculación. El contenido de ADN se expresó en ng por 100 ng del total de ADN genómico aislado de los tallos de plantas infectadas. Cada barra representa la media de cuatro ensayos independientes que incluyeron dos réplicas de cada muestra de ADN. Las barras de error representan el error estándar.

Para analizar del crecimiento del silvestre y del mutante $\Delta chsV$ durante la co-inoculación de plantas de tomate, se utilizó PCR cuantitativa a tiempo real sobre ADN aislado de tallos de plantas infectadas con la estirpe

silvestre a concentración 0.1x y con el mutante $\Delta chsV$ a concentración 1x, por separado o simultáneamente. Para discriminar la amplificación de ADN genómico de cada estirpe en plantas co-inoculadas, se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos. La pareja ChsV-3 y ChsV-26 (Tabla 5) amplifica un fragmento genómico del gen *chsV* presente sólo en la estirpe silvestre (Madrid *et al.*, 2003), mientras que la pareja ChsV-6 y Gpda-16 (Tablas 4 y 5) amplifica un fragmento presente en el genoma de la estirpe $\Delta chsV$ correspondiente al casete de resistencia a higromicina que interrumpe al gen *chsV* (Madrid *et al.*, 2003). La especificidad de los cebadores fue corroborada por PCR estándar a tiempo final (datos no mostrados). La concentración de ADN fúngico de cada estirpe fue calculada a partir de curvas estándar (Figura 29). Los incrementos de Ct calculados a partir de las ecuaciones obtenidas fueron 1.066 para la detección de la estirpe silvestre, y 1.119 para la detección del mutante $\Delta chsV$.

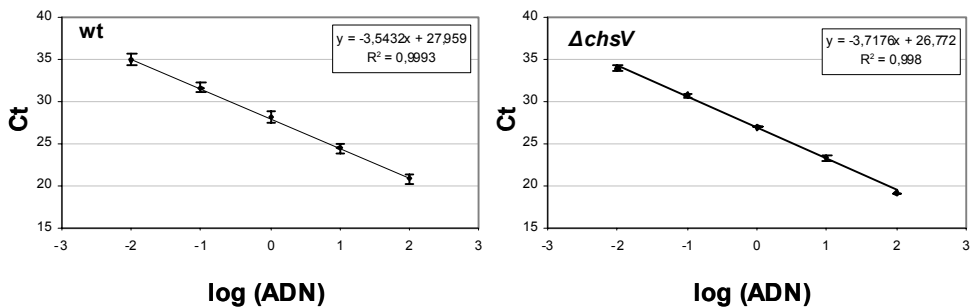


Figura 29. Curvas estándar obtenidas al representar el logaritmo de concentraciones conocidas de ADN de cada estirpe de *Fusarium* (100 – 0.01 ng) frente a los valores de Ct obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real. Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados de la cuantificación de ADN fúngico durante la co-infección (Figura 30) indican que la cantidad de biomasa fúngica aumenta a lo largo del curso de la infección en plantas inoculadas con la estirpe silvestre, obteniéndose los niveles más altos 5 y 7 días después de la inoculación. Por el contrario, se detectaron niveles muy bajos de la estirpe silvestre en plantas co-inoculadas. Por otro lado, la cantidad de biomasa fúngica del mutante disminuyó a lo largo del curso de la infección, tanto en infecciones sencillas como en co-infecciones, obteniéndose los niveles más bajos 7 días tras la inoculación. Las diferencias observadas en la cantidad de

biomasa fúngica de cada estirpe se deben a la diferente eficiencia de los oligonucleótidos utilizados en cada caso.

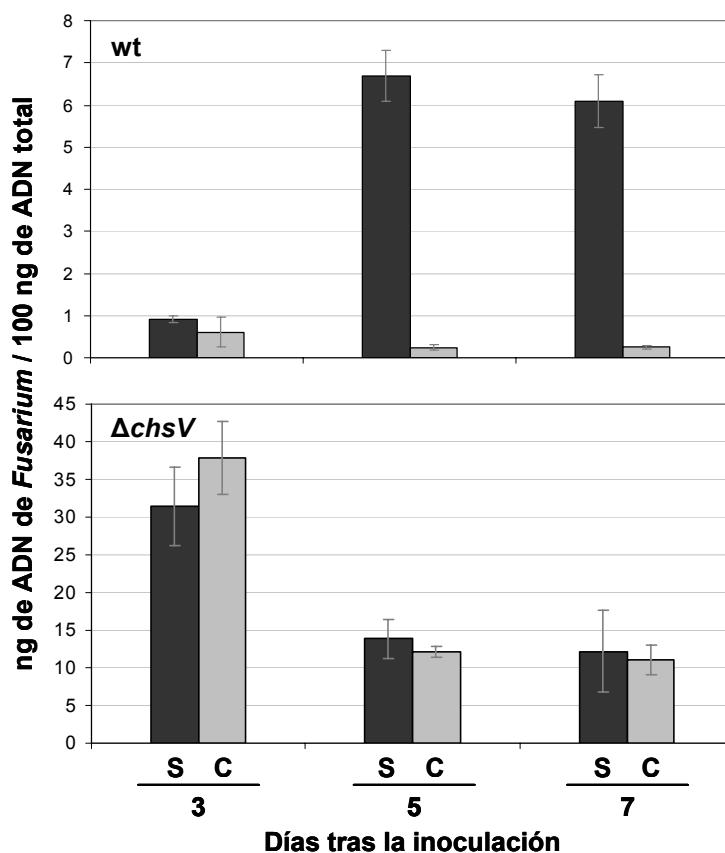


Figura 30. Cuantificación *in planta* del ADN de *Fusarium* durante la co-infección 3, 5 y 7 días después de la inoculación. El contenido de ADN se expresó en ng por 100 ng del total de ADN genómico aislado de los tallos de plantas infectadas con cada estirpe (S, barras negras) o co-infectadas con la estirpe silvestre y la mutante $\Delta chsV$ a concentración 0.1x:1x respectivamente (C, barras grises). Cada barra representa la media de cuatro ensayos independientes que incluyeron dos réplicas de cada muestra de ADN. Las barras de error representan el error estándar.

2.3. Ensayos de inhibición fúngica

Para excluir la posibilidad de que el mutante $\Delta chsV$ pudiera inhibir el crecimiento de la estirpe silvestre, se llevaron a cabo ensayos de inhibición fúngica *in vitro*, mediante el co-cultivo de ambas estirpes en medio mínimo SM sólido y líquido (Figura 31). No se detectó reducción del crecimiento del silvestre en presencia de la estirpe mutante, lo que indica que el mutante

ΔchsV no produce inhibidores del crecimiento fúngico que pudieran actuar en el interior de plantas co-infectadas.

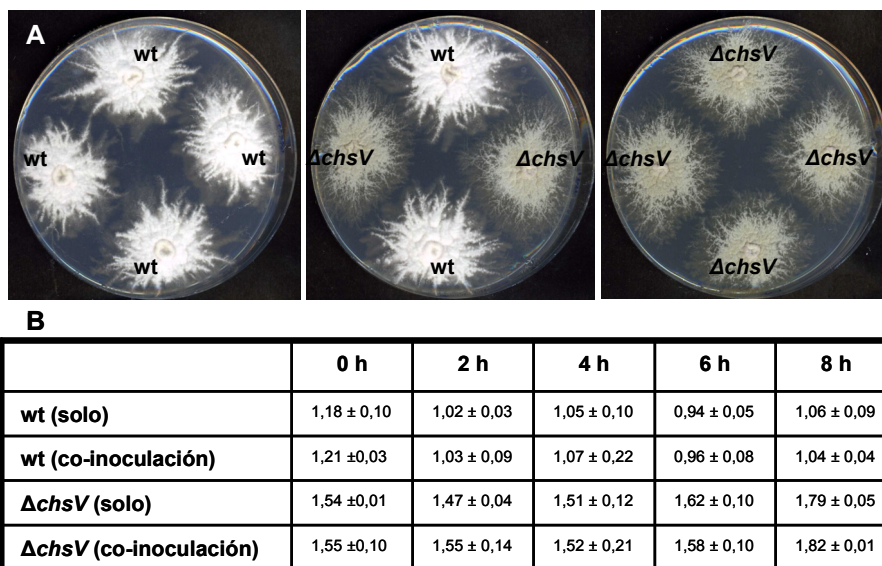


Figura 31. A, Crecimiento micelial de la estirpe silvestre y del mutante *ΔchsV* en medio sólido SM. Se inocularon 10^3 esporas de cada estirpe, y se incubaron a 28 °C durante 7 días. **B**, Número de esporas viables $\times 10^5$ /ml de las estirpes wt o *ΔchsV* en las condiciones indicadas a lo largo del tiempo, según conteo de unidades formadoras de colonias en medio sólido SM.

2.4. Expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de plantas en raíces de plantas coinfectadas

La reacción de defensa de la planta en respuesta a la co-infección con las estirpes silvestre y mutante *ΔchsV* se determinó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de varios genes relacionados con la defensa de la planta 24 horas y 3, 5 y 7 días tras la inoculación. Los genes analizados fueron: *lin6*, que determina una invertasa extracelular (Hedley *et al.*, 1994); *gluA* y *gluB*, responsables de una glucanasa ácida y una básica, respectivamente (van Kan *et al.*, 1992); *chi3* y *chi9*, que determinan las chitinases ácida 3 y básica 9 (Danhash *et al.*, 1993); y *pr1*, responsable de la proteína relacionada con la patogénesis 1 (van Kan *et al.*, 1992).

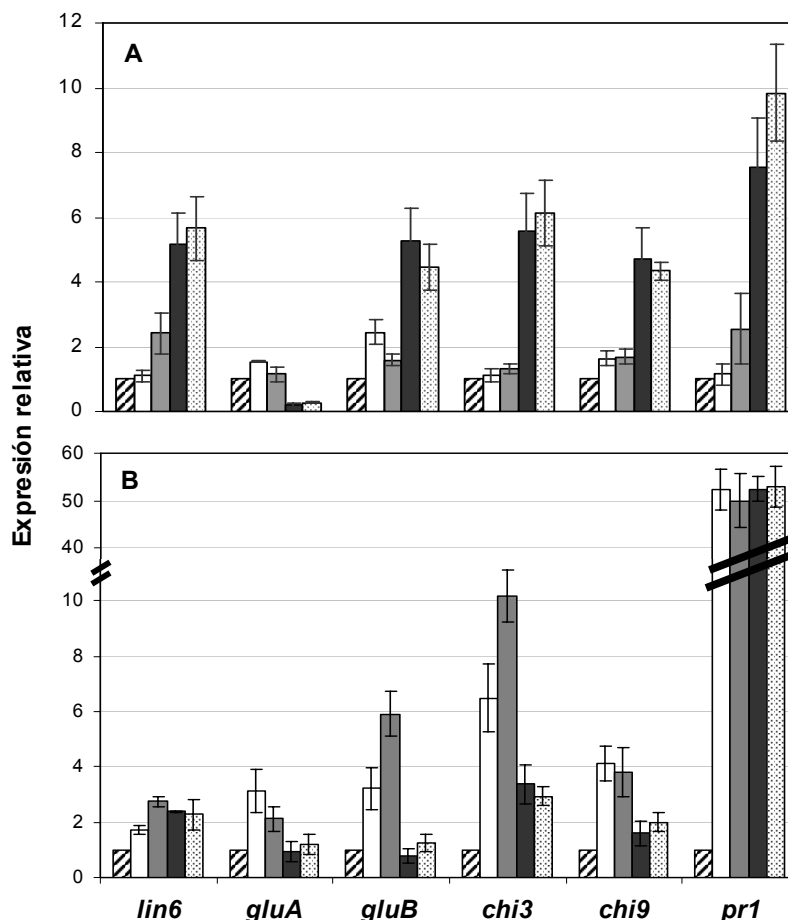


Figura 32. Expresión de genes de defensa en plantas de tomate no inoculadas (barras rayadas) o inoculadas con la estirpe silvestre a concentración 0.1x (barras blancas), 1x (barras grises), la estirpe mutante $\Delta chsV$ a concentración 1x (barras negras) y co-infectadas con ambas estirpes a concentración 0.1x:1x respectivamente (barras punteadas), 24 horas (a) o 5 días (b) después de la inoculación. La abundancia de transcritos fue determinada mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las barras de error indican el error estándar calculado a partir de cuatro experimentos independientes incluyendo dos réplicas cada uno.

El nivel de expresión de cada gen fue normalizado con el gen constitutivo de tomate *gapdh*, que determina la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (Shih *et al.*, 1991), y comparando las plantas infectadas con la estirpe silvestre a concentraciones 0.1x y 1x, plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$ a concentración 1x o plantas co-inoculadas con ambas estirpes a concentración 0.1x:1x (wt: $\Delta chsV$), con plantas no infectadas (condición de referencia), según el método $\Delta\Delta Ct$.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *lin6*, *gluA*, *gluB*, *chi3*, *chi9* y *pr1* entre plantas infectadas con la estirpe silvestre y plantas no infectadas 24 horas después de la inoculación (Figura 32a). Adicionalmente, la expresión de estos genes, excepto *gluA*, aparece inducida hasta 7 veces en plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$, y entre 5 y 10 veces más en plantas co-infectadas. Por el contrario, la expresión del gen *gluA* parece ser 5 veces inferior en plantas inoculadas con el mutante $\Delta chsV$ y plantas co-inoculadas que en plantas no infectadas (Figura 32a). Cinco días después de la inoculación, los niveles de expresión de los genes estudiados varían (Figura 32b). En el caso de *lin6*, los niveles de expresión en plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$ y en plantas co-inoculadas descendieron hasta valores similares a los que presentaban las plantas infectadas con la estirpe silvestre. En el caso de *gluA*, la expresión aumenta en todas las condiciones, siendo superior en plantas infectadas con la estirpe silvestre. La expresión de los genes *gluB*, *chi3* y *chi9* cinco días después de la inoculación aumentó entre 4 y 10 veces en plantas infectadas con la estirpe silvestre y descendió en plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$ y en plantas co-inoculadas, en comparación con los niveles observados 24 horas después de la inoculación. Por último la expresión del gen *pr1* aumentó 50 veces más en todas las condiciones, sin encontrar diferencias entre ellas (Figura 32b). No se encontraron diferencias de expresión de estos genes entre 1 y 3 días ni entre 5 y 7 días.

2.5. Detección de la actividad quitinasa en raíces de plantas co-infectadas

Normalmente durante la interacción con hongos las plantas aumentan su actividad quitinasa (Dalisay y Kuc, 1995; Heath, 1996). Por ello, en este trabajo se han determinado las actividades endo- y exo- quitinasas en tallos de plantas infectadas durante 3 días con la estirpe silvestre a concentración 0.1x y 1x; el mutante $\Delta chsV$ a concentración 1x y plantas co-inoculadas con ambas estirpes silvestre y mutante a concentración 0.1x:1x respectivamente empleando el kit comercial *Chitinase Assay Kit Fluorimetric* (Sigma). Las plantas inoculadas con el mutante $\Delta chsV$ solo o co-inoculadas con ambas estirpes mostraron actividad endo-quitinasa superior a la

detectada en plantas infectadas con la estirpe silvestre sola, con un máximo a los 3 días después de la inoculación (Figura 33).

No se encontraron diferencias significativas en la actividad exo-quitinasa entre plantas infectadas con las diferentes estirpes (resultados no mostrados). Las plantas no inoculadas mostraron niveles basales de actividad quitinasa (endo- y exo-), que permanecieron constantes a lo largo del experimento.

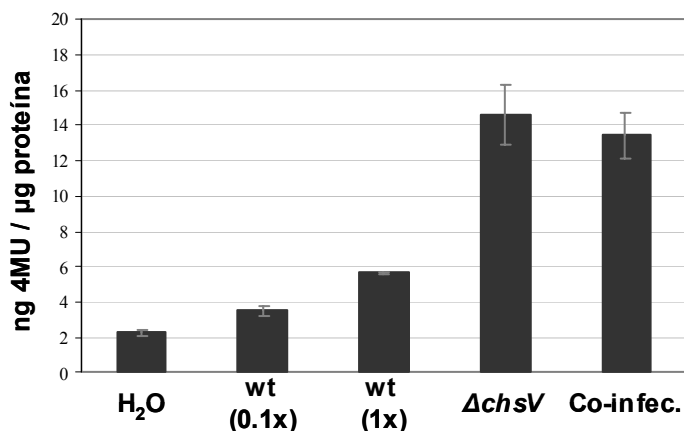


Figura 33. Actividad endo-quitinasa en tallos de plantas de tomate inoculadas con las estirpes indicadas 3 días después de la infección. Las plantas no inoculadas (H₂O) fueron usadas como control. La actividad quitinasa fue expresada como ng de 4-metilumbeliferona (4MU), liberados del sustrato apropiado por µg de proteína. Las barras de error indican el error estándar de tres experimentos independientes.

2.6. Expresión de genes de *F. oxysporum*, responsables de enzimas hidrolíticas de pared celular, durante la infección de plantas de tomate

Las enzimas degradativas de pared celular secretadas por hongos tienen múltiples funciones en virulencia, que incluyen la penetración, la adquisición de nutrientes, la remodelación de la pared celular del propio patógeno y la elicitación de la respuesta de defensa de la planta (Wanjiru *et al.*, 2002; Di Pietro *et al.*, 2009). *F. oxysporum* produce una amplia variedad de estas enzimas, pertenecientes a diferentes familias de glicosil hidrolasas (GHs) como pectinasas, celulasas y xilanasas, entre otras.

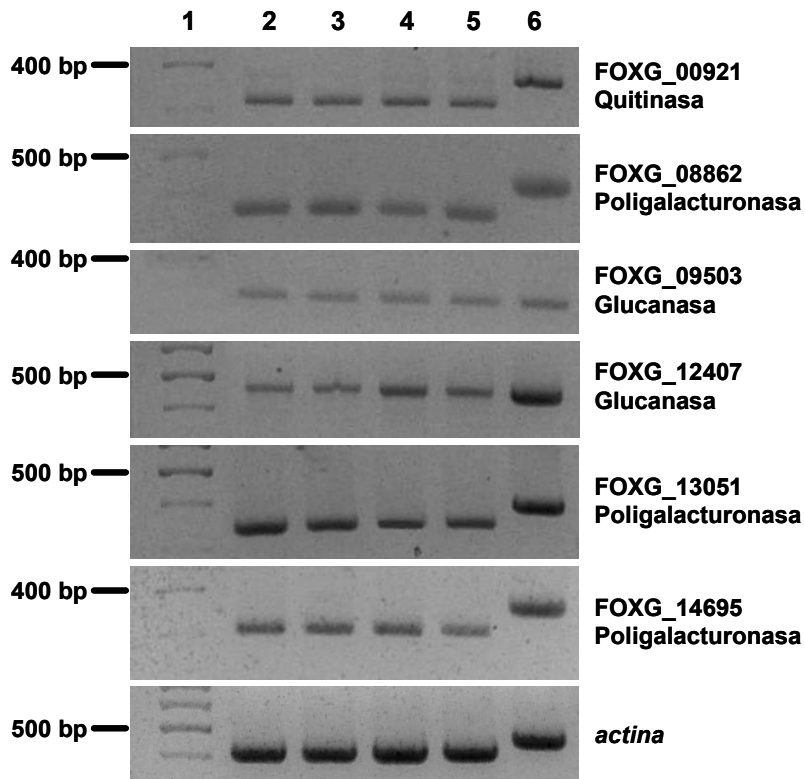


Figura 34. Análisis de expresión de genes glicosil hidrolasas. El nivel de transcritos de los genes se determinó por RT-PCR a tiempo final en raíces de plantas inoculadas con la estirpe silvestre a concentración 0.1x (línea 2), a concentración 1x (línea 3), el mutante $\Delta chsV$ a concentración 1x (línea 4) y plantas co-infectadas con la estirpe silvestre y el mutante a concentración 0.1x:1x respectivamente (línea 5). La línea 1 muestra los marcadores de tamaño usados. El gen *actina* fue usado como un control interno. La amplificación de los ADNs genómicos fue usada como control positivo de la PCR (línea 6).

Para investigar si durante las primeras etapas de la infección la estirpe silvestre y el mutante $\Delta chsV$ expresaban de manera diferencial algún gen responsable de estas enzimas, se realizaron experimentos de RT-PCR a tiempo final usando como molde ARN aislado de raíces de plantas de tomate 3 días después de la inoculación. El análisis incluyó 21 genes pertenecientes a diferentes familias de glicosil hidrolasas como β -glucoronidasas (GH79), β -1,3-glucanasas (GH64), poligalacturonasas (GH28) o quitinasas (GH18) (Tabla 5). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcritos en plantas inoculadas con estas estirpes (Figura 34).

3. Discusión

Para esclarecer las bases moleculares de la incapacidad del mutante $\Delta chsV$ de *F. oxysporum* para causar la marchitez vascular en plantas de tomate, se plantea la hipótesis de que, como consecuencia de la alteración de su pared celular, esta estirpe podría elicitar rápidamente la respuesta de defensa de la planta, lo que conllevaría una restricción de la colonización del hongo. Si esta hipótesis fuera correcta, una planta que detecte la presencia del mutante, podría defenderse reduciendo los síntomas de enfermedad provocados por la estirpe silvestre. En este trabajo se han llevado a cabo experimentos de co-inoculación de plantas con ambas estirpes, y se ha observado un retraso en la aparición de los síntomas de marchitez en las plantas co-inoculadas. Este efecto protector es específico del mutante deficiente en la síntesis de pared $\Delta chsV$, ya que otros mutantes no patógenos, como $\Delta fmk1$ y $\Delta gas1$, no protegen de la enfermedad. Trabajos anteriores han descrito que la inoculación de plantas con aislados avirulentos de *F. oxysporum* puede resultar en una reducción significativa de los síntomas de enfermedad causados por aislados virulentos de la misma o de otra forma *specialis* (Huertas-González *et al.*, 1999; Larkin y Fravel, 1999; Bolwerk *et al.*, 2005; Olivain *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a que se trata de aislados no patógenos de suelo, no hay suficiente conocimiento sobre las bases moleculares y bioquímicas que los diferencian de las estirpes patógenas. Algunos autores han propuesto el uso de mutantes no patógenos como agentes de biocontrol de la patogénesis fúngica. Se ha descrito que el mutante no patógeno del ascomiceto *Colletotrichum magna* (path-1) es capaz de colonizar la planta hospedadora sin inducir los síntomas de enfermedad y protegerla frente a la infección de *C. magna*, *F. oxysporum* (Freeman y Rodríguez, 1993) y *C. orbiculare* (Redman *et al.*, 1999a). Este mutante no patógeno es deficiente en la producción y secreción de las enzimas pectato liasa y endopoligalacturonasa (Wattad, 1995), y elicitaba una respuesta de defensa más rápida, intensa y localizada en las plantas (Redman *et al.*, 1999b). De la misma forma, el mutante no patógeno de *C. magna* R1, afectado en patogénesis, confiere protección a plantas de sandía contra la estirpe silvestre (Redman *et al.*, 1999b). Asimismo, el mutante no patógeno

de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* 4/4 reduce significativamente la mortalidad de plantas de melón causada por *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (razas 1 y 2) y por *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (raza 2) (Freeman *et al.*, 2001).

La causa de la protección originada por el mutante de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Δ *chsV* podría deberse a algún efecto competitivo con la estirpe silvestre. El hecho de que la protección aumente cuanto mayor es la densidad de inóculo del mutante no patógeno con respecto a la estirpe silvestre sugiere que ambas estirpes podrían competir por los nutrientes y por el espacio en la rizosfera. La competición por nutrientes, especialmente por glucosa, ha sido propuesta como el principal mecanismo de biocontrol del aislado no patógeno Fo47 (Bolwerk *et al.*, 2005; Larkin y Fravel, 1999; Lemanceau *et al.*, 1993). En caso del mutante Δ *chsV*, la posibilidad de que la protección se deba a la competición por los sitios de infección en la superficie de la raíz queda excluida, ya que el efecto protector también se observa cuando la estirpe no patógena se inocula después de la adhesión a la raíz de las esporas del silvestre. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la competición por los tejidos de la planta, ya que, según los ensayos de cuantificación de biomasa fúngica en el interior de los tallos, el mutante Δ *chsV* parece alcanzar el tallo de forma más rápida que la estirpe silvestre.

Por otro lado, la reducción en la biomasa del mutante detectada a lo largo del curso de la infección, junto con la baja proporción de biomasa del silvestre presente en los tallos de plantas co-infectadas sugieren la activación de la respuesta de defensa de la planta mediada por el mutante Δ *chsV*, que resulta en la restricción de la colonización fúngica. Además, para excluir la posibilidad de que el crecimiento de la estirpe mutante tenga un efecto inhibitorio y/o antagonico con el del silvestre, se han realizado experimentos de co-cultivo en medio mínimo que descartan este fenómeno.

El análisis de la expresión de genes de plantas relacionados con la respuesta de defensa reveló una acumulación diferencial de los transcritos de los genes *lin6*, *gluA*, *gluB*, *chi3*, *chi9* y *pr1* en plantas inoculadas con el mutante no patógeno, en comparación con plantas inoculadas con la estirpe

silvestre. La acumulación de los transcritos de los genes *lin6*, *gluB*, *chi3*, *chi9* y *pr1* parece ocurrir antes en plantas infectadas con el mutante $\Delta chsV$ y en plantas co-inoculadas que en plantas infectadas solo con la estirpe silvestre. Además, se detectaron niveles superiores de actividad endo-quitinasa en plantas inoculadas con el mutante $\Delta chsV$, solo o en co-infección con la estirpe silvestre. La alteración de la respuesta de defensa de plantas frente a la infección con aislados no patógenos de *Fusarium* ha sido estudiada en la interacción con otros hospedadores (van Kan *et al.*, 1992). Plantas inoculadas con la estirpe no patógena Fo47 muestran deposiciones en la pared celular y un aumento con la expresión de las proteínas PR-1, quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucosidasa (Benhamou *et al.*, 2001; Duijff *et al.*, 1998; Fuchs *et al.*, 1997; Olivain *et al.*, 2003). Por otro lado, plantas tratadas con el aislado no patógeno de *Fusarium* CS-20 presentan una acumulación anormal de compuestos fenólicos (Panina *et al.*, 2007), y plantas infectadas con el aislado Fs-K muestran expresión atenuada de los genes *pr-5* y *pr-7* (Kavroulakis *et al.*, 2007).

La elicitación de las reacciones de defensa de la planta ha sido atribuida a la secreción por el patógeno de cantidades elevadas de enzimas degradativas de pared celular vegetal (Di Pietro *et al.*, 2003). Sin embargo, el mutante $\Delta chsV$ no mostró expresión diferencial de estos genes durante la infección de plantas de tomate, lo que sugiere que la alteración en la pared fúngica no tiene un efecto pleiotrópico sobre la expresión de los genes analizados.

Teniendo en cuenta todos estos datos, los resultados presentados en este capítulo validan la hipótesis de que la pérdida de patogenicidad del mutante $\Delta chsV$ se debe a una rápida elicitación de la respuesta de defensa de la planta que conduce a la restricción de la colonización fúngica. Por tanto, el mutante podría ser considerado como un protector potencial de la marchitez vascular causada por la estirpe silvestre de *F. oxysporum*. De hecho, dicho mutante comparte características comunes con otras cepas usadas como agentes de biocontrol, como son la capacidad para germinar y colonizar intensamente la superficie de la raíz, penetrar la planta y vivir

saprotíficamente en el interior de la misma sin inducir los síntomas de enfermedad, pero elicitando la respuesta de defensa de la planta de forma rápida e intensa (Fravel *et al.*, 2003).

Capítulo 3

Aislamiento y caracterización del gen *con7-1*, un factor regulador del crecimiento y la patogénesis en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

1. Introducción

Los factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo morfológico son esenciales para el proceso de infección de los hongos patógenos. Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción Con7p es un regulador central de la morfogénesis relacionada con la infección en el patógeno de arroz *Magnaporthe grisea* (Odenbach *et al.*, 2007). El gen *con7* parece estar presente en el genoma de todos los hongos filamentosos euascomicetos, y curiosamente, está ausente en las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Candida* (Odenbach *et al.*, 2007). El mutante de *M. grisea* deficiente en este regulador transcripcional no es capaz de formar apresorios, una estructura de infección especializada desarrollada generalmente por patógenos foliares de plantas, y por tanto no puede penetrar las hojas de la planta ni crecer en su interior (Shi y Leung, 1995; Odenbach *et al.*, 2007). Además se ha descrito que Con7p participa activamente en la esporulación de *M. grisea* (Shi *et al.*, 1998). La identificación de los genes controlados por este factor de transcripción ha revelado que Con7p de *M. grisea* regula varios genes implicados en morfogénesis y patogénesis, incluyendo algunos de la biogénesis y remodelación de la pared celular fúngica, como son *chs7*, un gen sintasa de quitina de clase VI (Odenbach *et al.*, 2009) o *cbp1* y *cbp2*, que determinan proteínas de unión a quitina; *pth11*, factor de señalización durante la interacción con el hospedador y genes implicados en la superación de las defensas de la planta, homólogos a la avenacinasa, que determina una enzima detoxificadora de compuestos antifúngicos producidos por las plantas.

Con7p de *M. grisea* pertenece a la familia de factores de transcripción con dominio de unión al ADN del tipo dedo de zinc. Este dominio incluye una secuencia de 25 a 30 aminoácidos, de los cuales dos cisteínas y dos histidinas aparecen en posiciones conservadas y coordinan tetraédricamente un ión Zn^{+2} . Esta unión obliga al plegamiento de la cadena

peptídica, de forma que el motivo se caracteriza por una conformación tridimensional alargada, en forma de “dedo”, a quien debe su nombre.

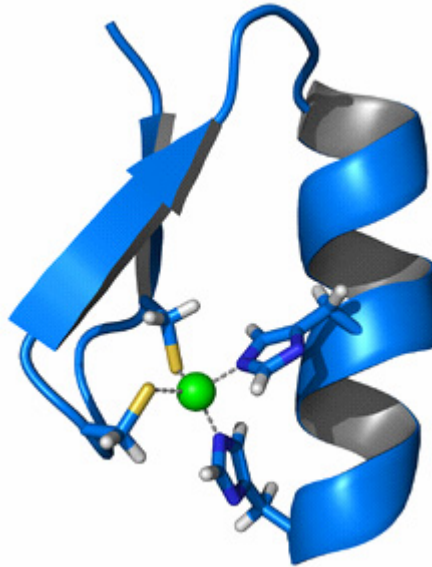


Figura 35. Representación del motivo de dedo de zinc C_2H_2 . El ión de zinc (verde) está coordinado por dos histidinas (azul oscuro) y dos cisteínas (amarillo). Dibujo de Thomas Splettstoesser, según análisis de la estructura mediante difracción de rayos X.

Además, la proteína Con7p de *M. grisea* presenta una señal de localización nuclear; una región “coiled-coil”, que sugiere la formación de dímeros con ella misma o con otras proteínas; y una región rica en prolina y glutamina, que puede constituir un dominio de transactivación (Mitchell y Tjian, 1989).

En este capítulo de la Tesis se describe la inactivación dirigida en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* del gen ortólogo a *con7* de *M. grisea*, y el análisis patotípico y fisiológico de los mutantes obtenidos. A pesar de que *F. oxysporum* no forma ninguna estructura especializada durante la penetración de la raíz, *con7* podría desempeñar una función esencial en el desarrollo morfológico del hongo que afectara a su capacidad de infección.

Según la base de datos del genoma de *F. oxysporum*, *con7-1* contiene una ORF de 1527 pb, interrumpida por cuatro intrones de 75, 162, 67 y 41 pb en las posiciones 408, 715, 1057 y 1467, respectivamente, que determina una proteína deducida de 394 aminoácidos. *con7-2* y *con7-3* son idénticos y presentan una ORF de 1043 pb organizada en tres exones interrumpidos por dos intrones de 171 y 71 pb situados en las posiciones 297 y 645, respectivamente, que determinan proteínas de 267 aminoácidos. La proteína Con7-1 deducida de *F. oxysporum* presentó una identidad del 68.9% con Con7p de *M. grisea*, y del 55.3% con las proteínas deducidas de *con7-2* y *con7-3* de *F. oxysporum*. Estas últimas mostraron una identidad del 44.9% con Con7p de *M. grisea*.

El análisis de las proteínas Con7 de *Fusarium* utilizando los servidores CBS prediction (www.cbs.dtu.dk/services) y PROSITE (www.expasy.ch/prosite), reveló la presencia de un dominio de unión a ADN del tipo dedo de zinc $C_2H_2-Zn^{+2}$ muy conservado, además de una señal de localización nuclear y una región "coiled-coil", también presentes en Con7p de *M. grisea* (Figura 36). Por otro lado, todas las secuencias comparten una región rica en prolina y glutamina cerca del extremo carboxilo.

2.2. Procesamiento diferencial de intrones en el gen *con7-1*

Para determinar si, como ocurre en *M. grisea*, en *F. oxysporum* el gen *con7* se procesa de forma diferencial, produciendo distintos transcritos, el ARN obtenido a partir de micelio de la estirpe silvestre crecida en medio mínimo SM sólido durante 24 horas se amplificó mediante RT-PCR a tiempo final con los oligonucleótidos Con71-15B y Con71-16H (Tabla 5). Los fragmentos obtenidos se clonaron en pGEM-T y se secuenciaron para su identificación.

Entre las 26 secuencias analizadas, se observaron cuatro tipos de transcritos. 15 transcritos (57.7%) mostraron la secuencia esperada según la secuencia anotada en la base de datos de *Fusarium*, con 4 intrones y 5 exones (Figura 37a). 6 de las secuencias (23.1%) presentaban el

procesamiento de un nuevo intrón de 60 pb situado en la posición 162, obteniéndose una ORF de 6 exones separados por 5 intrones (Figura 37b). 4 secuencias (15.4%) no procesaron el intrón de 75 pb situado en la posición 408, quedando una ORF con 3 intrones y 4 exones (Figura 37c). Finalmente, una secuencia (3.8%) procesó un fragmento de 21 pb adyacente al primer intrón, situado en la posición 387, por lo que este primer intrón, en lugar de 75 pb, alcanza una longitud de 96 pb (Figura 37d).

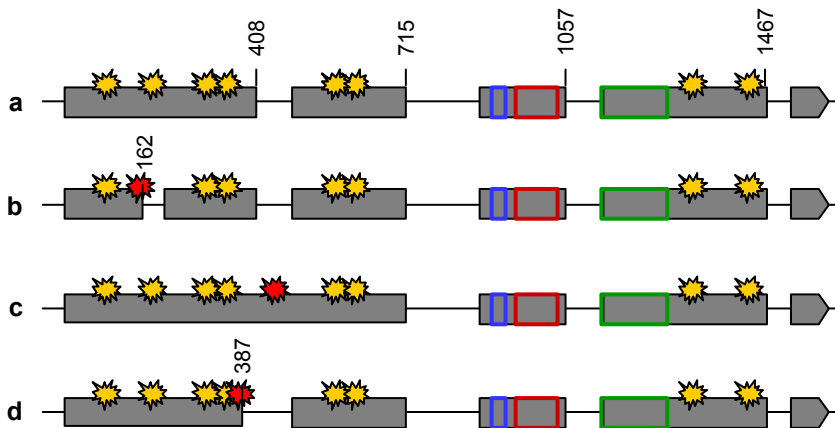


Figura 37. Procesamiento diferencial de intrones en *con7-1*. Las cajas de colores indican los dominios conservados de la proteína Con7-1 (ver figura 36). Las estrellas indican los sitios de fosforilación esperados según el análisis con el servidor CBS prediction: en amarillo los que son comunes a los cuatro tipos de ADNc; en rojo los exclusivos de cada ADNc. Los números indican las posiciones del inicio de los intrones a partir del comienzo de la ORF.

Este procesamiento diferencial de intrones da lugar a cuatro versiones distintas y de diferente tamaño de la proteína Con7-1. Sin embargo, como el procesamiento diferencial afecta a la región 5' del transcrito, las proteínas que se obtendrían no presentarían alteración alguna en el sitio de unión a ADN, el dominio de localización nuclear o la región "coiled-coil". Por otro lado, el análisis de las secuencias aminoacídicas según el servidor CBS prediction reveló que tres de ellas presentan sitios de fosforilación únicos que no se encuentran en ninguna otra forma de las proteínas Con7-1 deducidas (Figura 37).

2.3. Interrupción dirigida del gen *con7-1* en *F. oxysporum*

Para estudiar la implicación de *con7-1* en la patogénesis de *F. oxysporum*, se generaron estirpes mutantes portadoras de un alelo interrumpido del gen mediante reemplazamiento génico. Para ello se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre con un fragmento de ADN lineal conteniendo una copia del gen en el que el dominio de unión a ADN se substituyó por el casete de resistencia a higromicina B (Figura 38a). Se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se purificó su ADN genómico.

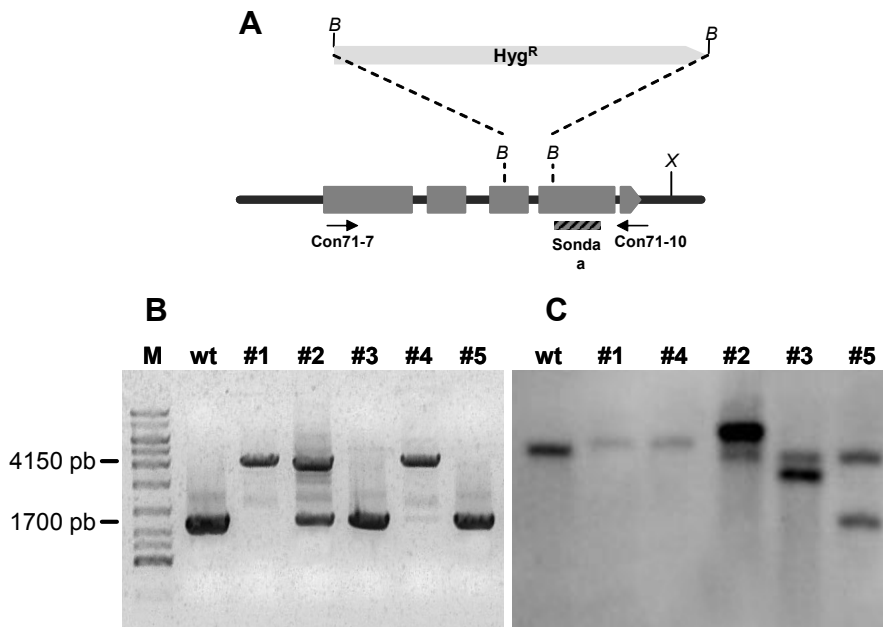


Figura 38. Interrupción dirigida del gen *con7-1* de *F. oxysporum*. **A**, Mapa de restricción de la región genómica y del vector de disrupción. La región codificante se indica con la orientación de la fase abierta de lectura. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del vector de disrupción. El cassette de resistencia a higromicina (Hyg^R) se muestra con una flecha de color gris claro. Los sitios de restricción son: X = *Xho*I, y B = *Bam*HI. **B**, Análisis mediante PCR del patrón de amplificación de *con7-1* en las estirpes indicadas. **C**, Análisis *Southern* del ADN de las estirpes indicadas tratados con *Xho*I e hibridados con la sonda "a". wt = estirpe silvestre; #1 y #4 = transformantes por recombinación homóloga; #2, #3 y #5 = transformantes ectópicos.

La comprobación del suceso de recombinación homóloga se realizó inicialmente por PCR usando los oligonucleótidos externos de la construcción

(Con71-7 + Con71-10, Tabla 5). Seis transformantes mostraron bandas de amplificación que indicaban el reemplazamiento del alelo silvestre (Figura 38b).

Posteriormente se confirmó la identidad de estos transformantes por disrupción mediante hibridación *Southern* del ADN tratado con la enzima *XhoI*, usando como sonda un fragmento interno de la región codificante del gen *con7-1*. Los transformantes por recombinación homóloga reemplazaron la banda de hibridación correspondiente al alelo silvestre por otra de 2.5 kb mayor. Los transformantes ectópicos mostraron la banda del alelo silvestre y otras adicionales correspondientes a inserciones ectópicas del alelo interrumpido (Figura 38c).

2.4. Interrupción dirigida de los genes *con7-2* y *con7-3* en *F. oxysporum*

Debido a que la región genómica que contiene los genes *con7-2* y *con7-3* está duplicada en el genoma, para analizar su papel en patogénesis, se generaron estirpes mutantes con ambos genes interrumpidos simultáneamente. Para ello se transformaron protoplastos de la estirpe silvestre con un fragmento de ADN lineal conteniendo un segmento de ADN genómico en que parte del promotor y del comienzo de la ORF se había sustituido por el casete de resistencia a higromicina B (Figura 39a).

Se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se purificó su ADN genómico. La recombinación homóloga se comprobó en primer lugar mediante PCR con los oligonucleótidos externos de la construcción Con72-1 + Con72-4 (Tabla 5). Tres de los 14 transformantes analizados mostraron bandas de amplificación que indicaban el reemplazamiento del alelo silvestre (Figura 39b).

Posteriormente se confirmó la identidad de estos transformantes por recombinación homóloga mediante hibridación *Southern* del ADN tratado con la enzima *XhoI*, usando como sonda un fragmento interno de la región

codificante del gen *con7-2*. Los transformantes por recombinación homóloga reemplazaron la banda del alelo silvestre por otra de mayor tamaño. Los transformantes ectópicos mostraron la banda del alelo silvestre y otras adicionales correspondientes a inserciones ectópicas del alelo interrumpido (Figura 39c).

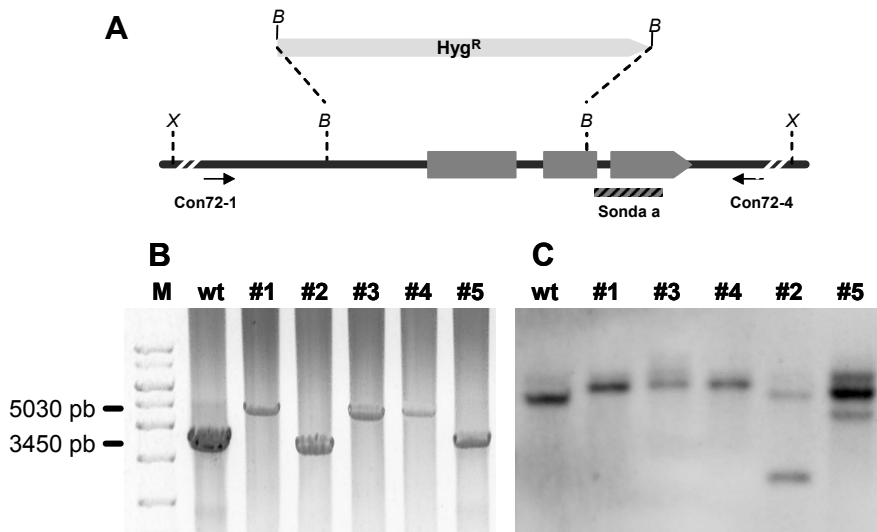


Figura 39. Interrupción dirigida de los genes *con7-2* y *con7-3* de *F. oxysporum*. **A**, Mapa de restricción de la región genómica y del vector de interrupción. La región codificante se indica con la orientación de la fase abierta de lectura. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del vector de interrupción. El cassette de resistencia a higromicina (Hyg^R) se muestra con una flecha de color gris claro. Los sitios de restricción son: X = *XhoI*, y B = *BamHI*. **B**, Análisis mediante PCR del patrón de amplificación de *con7-2/3* en las estirpes indicadas. **C**, Análisis *Southern* del ADN de las estirpes indicadas tratados con *XhoI* e hibridados con la sonda "a". wt = estirpe silvestre; #1, #3 y #4 = transformantes por doble recombinación homóloga; #2 y #5 = transformantes ectópicos.

2.5. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta\text{con7-1}$ y $\Delta\text{con7-2}\Delta\text{con7-3}$

2.5.1. Infección de plantas de tomate

Para determinar el papel de los genes *con7* en la patogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate con los mutantes sencillos $\Delta\text{con7-1}$ y dobles $\Delta\text{con7-2}\Delta\text{con7-3}$ obtenidos en este trabajo (Figura 40). Las raíces de plántulas de tomate del

cultivar Monika con 14 días de edad se sumergieron durante 30 minutos en una suspensión de 5×10^6 esporas/ml de la estirpe silvestre, de los mutantes nulos $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$, y de transformantes ectópicos de ambas construcciones génicas. A continuación, se sembraron en vermiculita y se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante las 2-3 semanas posteriores. La escala del índice de enfermedad utilizada varía de 1 a 5, siendo 1 planta sana y 5 planta muerta (Huertas-González *et al.*, 1999).

La severidad de los síntomas de enfermedad en plantas inoculadas con la estirpe silvestre aumentó a lo largo del experimento, estando la mayoría de las plantas muertas 20 días después de la inoculación. Las plantas inoculadas con los mutantes $\Delta con7-1$ no mostraron síntomas visibles de enfermedad, y se mantuvieron sanas a lo largo de todo el experimento. Por el contrario, las plantas inoculadas con el mutante doble $\Delta con7-2\Delta con7-3$, y las plantas inoculadas con los transformantes ectópicos mostraron un perfil de la enfermedad muy similar al silvestre (Figura 40).

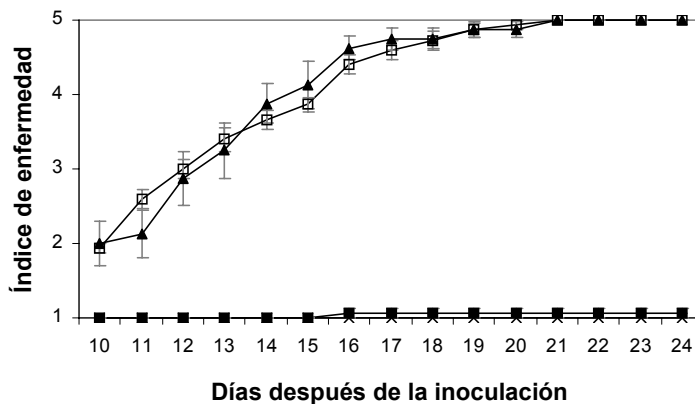


Figura 40. Virulencia de estirpes mutantes de *F. oxysporum* sobre plantas de tomate (cv. Monika). La severidad de los síntomas de enfermedad fue anotada durante varios días después de la inoculación, usando un índice que varía de 1 (planta sana) a 5 (planta muerta). Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre (□), el transformante $\Delta con7-1$ (■), el transformante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ (▲) y el control sin inocular (x). Las barras de error indican el error estándar de 15 plantas por cada experimento.

2.5.2. Crecimiento sobre frutos de tomate

Para estudiar el efecto de la anulación de los genes *con7* sobre la capacidad de proliferar en el tejido vivo del hospedador, se inyectó una suspensión conteniendo 2.5×10^5 esporas de las diferentes estirpes en frutos de tomate maduro y frutos de tomate verde, que contienen niveles altos del compuesto antifúngico α -tomatina (Lairini *et al.*, 1996). La figura 41 muestra los frutos de tomate inoculados con la estirpe silvestre, el mutante $\Delta con7-1$ y el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$, después de 3 días de incubación con 100% de humedad relativa. La estirpe silvestre y el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ colonizaron y maceraron el fruto alrededor del punto de inoculación, formando un micelio denso en su superficie. El mutante $\Delta con7-1$ también fue capaz de invadir los frutos, aunque mostró una reducción severa en su crecimiento. No se observaron diferencias entre el crecimiento de cada estirpe crecida en tomate rojo o verde.

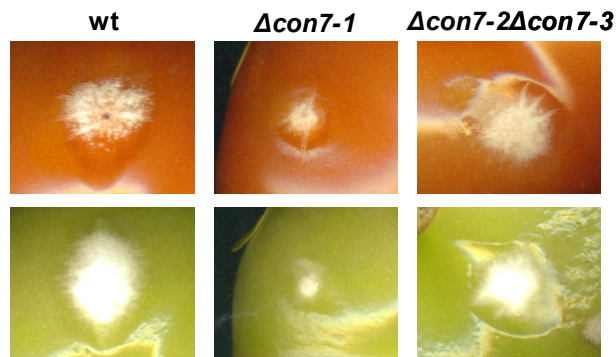


Figura 41. Crecimiento de la estirpe silvestre (wt), y los mutantes nulos $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$ en frutos de tomate maduros (panel superior) y verdes (panel inferior).

2.5.3. Capacidad de adhesión a raíces de tomate del mutante $\Delta con7-1$

Para determinar si el mutante $\Delta con7-1$, incapaz de causar enfermedad en plantas de tomate, se adhiere a sus raíces, se infectaron plantas de tomate con 2.5×10^6 esporas/ml y se mantuvieron en condiciones hidropónicas. Posteriormente las raíces se visualizaron 24 horas después de la inoculación por microscopía óptica. La observación reveló que tanto la

estirpe silvestre como el mutante $\Delta con7-1$ se adhieren a la superficie radicular, germinan y forman una red de hifas a lo largo de toda la raíz (Figura 42).

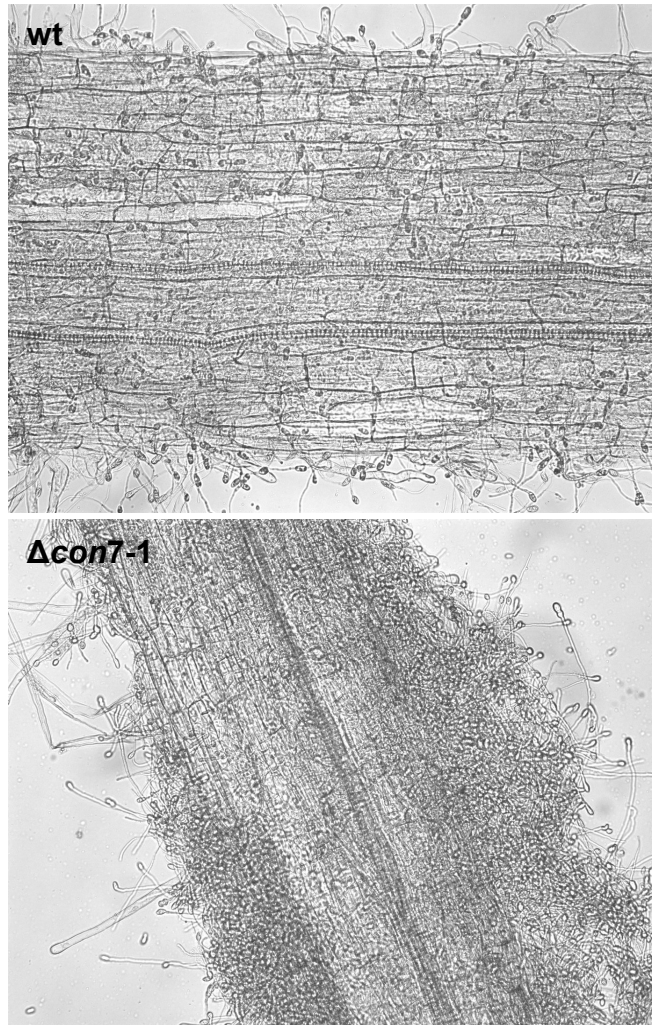


Figura 42. Micrografías que muestran la adhesión de la estirpe silvestre (wt) y del mutante $\Delta con7-1$ 24 horas después de la inoculación, obtenidas mediante la técnica Normarski a 20 aumentos.

2.6. Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$

2.6.1. Crecimiento en medio sólido y líquido

En primer lugar se analizó la morfología de las colonias originadas a partir de esporas únicas de cada estirpe en medio PDA. Tanto la estirpe silvestre como el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ crecen uniformemente formando colonias con simetría radial. Sin embargo, la estirpe mutante $\Delta con7-1$ presenta una forma asimétrica e irregular (Figura 43a). Por otro lado, las colonias formadas tras la inoculación de 5×10^4 esporas de la estirpe silvestre o por el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ en medio PDA presentaron mayor tamaño que la colonia del mutante $\Delta con7-1$ (Figura 43b). Se obtuvieron resultados similares cuando las distintas estirpes se cultivaron en medio mínimo SM.

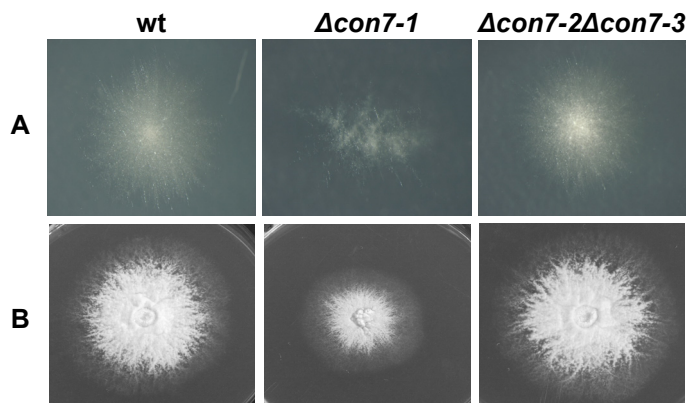


Figura 43. Crecimiento micelial de la estirpe silvestre (wt), el mutante $\Delta con7-1$ y el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ en medio PDA, a partir de una única espora (a) o a partir de un inóculo de 5×10^4 esporas.

La morfología del mutante $\Delta con7-1$ durante la germinación y las primeras horas de crecimiento en comparación con la estirpe silvestre se analizó mediante observación al microscopio de fluorescencia de germínulas de hasta 12 horas inoculadas en medio líquido PDB y teñidas con blanco de calcoflúor (CFW), un compuesto fluoróforo análogo a la quitina que tiñe específicamente la pared celular y las hifas. Se observó que las esporas del mutante $\Delta con7-1$ son más redondeadas que las esporas del silvestre. Por

otro lado, la estirpe silvestre germina elongando la célula bipolarmente, mientras que el mutante lo hace de manera unipolar, siendo posible distinguir la célula “madre”. Asimismo se observó que la estirpe silvestre forma las primeras ramificaciones entre las 9 y las 10 horas tras la inoculación, mientras que el mutante ramifica pasadas 12 horas, siendo el número de ramificaciones por hifa en el mutante menor que en la estirpe silvestre (Figura 44). Estas diferencias también se observaron en medio mínimo SM, con la excepción que las esporas del silvestre, al igual que el mutante, germinaron de manera unipolar.

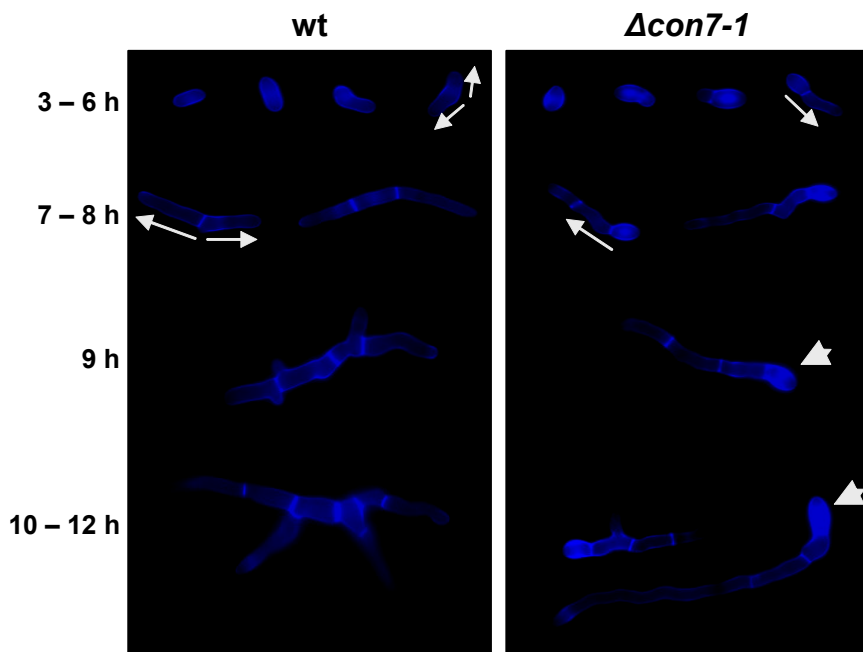


Figura 44. Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$. Las estirpes fueron inoculadas en medio PDB y teñidas con blanco de calcoflúor. Las flechas indican la dirección del crecimiento, mientras que las puntas de flecha indican la célula madre. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia a 40 aumentos.

La tasa de germinación del mutante $\Delta con7-1$ se determinó mediante recuento del número de esporas germinadas respecto al número de microconidias inoculadas en medio PDB o en medio SM, revelando que no existen diferencias significativas entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta con7-1$ en medio PDB, pero sí en medio mínimo SM. El mutante $\Delta con7-1$ mostró

una reducción significativa de la capacidad de germinación, con un retraso medio de cuatro horas para alcanzar tasas de germinación similares a la estirpe silvestre (Figura 45).

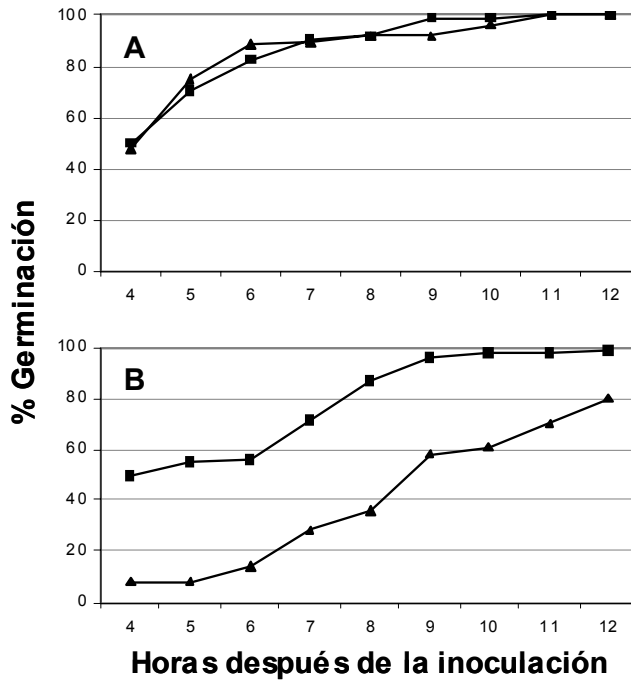


Figura 45. Porcentaje de germinación obtenido tras la inoculación de 5×10^5 esporas/ml en medio líquido PDB (a) o SM (b), de la estirpe silvestre (■) y del mutante $\Delta con7-1$ (▲).

La capacidad de conidiación del mutante $\Delta con7-1$ también se encuentra reducida. El recuento del número de esporas producidas por las estirpes silvestre y mutante en medio PDB a lo largo del crecimiento (1, 2, 3 y 4 días) reveló una reducción del 50% en la capacidad de conidiación del mutante (Figura 46).

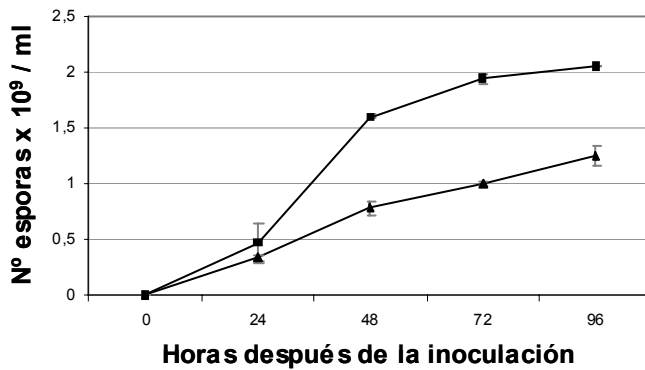


Figura 46. Conidiación de la estirpe silvestre (■) y del mutante $\Delta con7-1$ (▲). Se inocularon 1.6×10^6 esporas/ml de cada estirpe en medio PDB líquido para, posteriormente, contar el número de esporas producidas a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las barras indican el error estándar de 3 experimentos independientes.

Para comparar la dinámica de crecimiento de ambas estirpes se analizaron sus curvas de crecimiento en medio PDB y en medio mínimo SM. Para ello se inocularon 10^4 esporas en 200 μ l de medio, se incubaron las placas microtiter a 28°C durante 72 horas y se determinó la densidad óptica del cultivo a 595 nm a lo largo del tiempo. Los resultados indican que el mutante $\Delta con7-1$ tiene una severa reducción en la tasa de crecimiento en comparación con la estirpe silvestre, siendo el tiempo de generación del silvestre de aproximadamente 8 horas y del mutante 18 horas (Figura 47a), tanto en medio PDB como en SM.

Para analizar si la reducción del crecimiento en $\Delta con7-1$ se debe a un defecto en la producción de factores de crecimiento y si los factores de crecimiento liberados por el silvestre podrían remediar el defecto en el crecimiento de la estirpe mutante, se inocularon sus esporas en un filtrado de medio mínimo SM libre de esporas en el que previamente se había cultivado la estirpe silvestre durante 20 horas, y se monitorizó el incremento de la densidad óptica a 595 nm a lo largo del tiempo. No se observó mayor tasa de crecimiento del mutante en el medio en el que había crecido previamente la estirpe silvestre (Figura 47b).

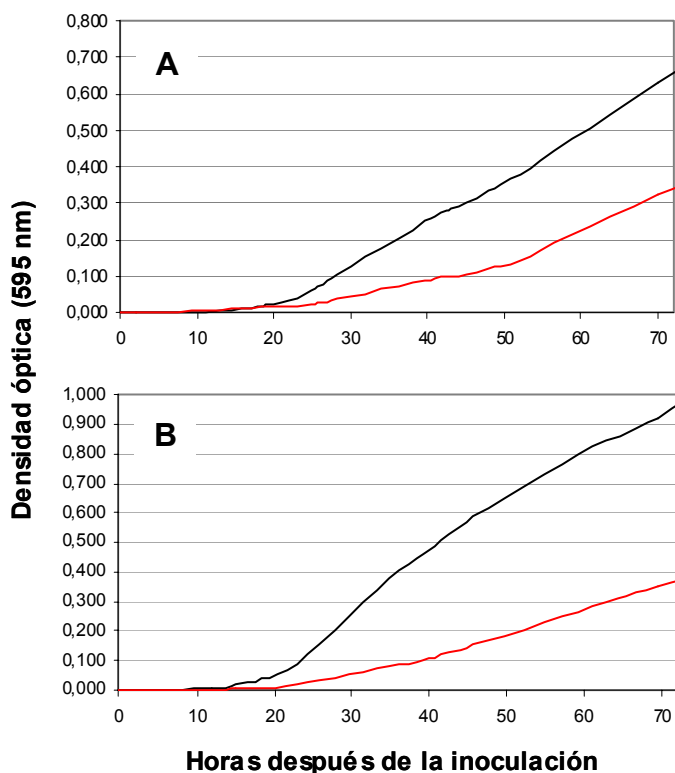


Figura 47. Crecimiento de la estirpe silvestre (línea negra) y del mutante $\Delta con7-1$ (línea roja), en medio SM (a) o en un filtrado libre de esporas de medio SM en el que ha crecido previamente la estirpe silvestre durante 20 horas (b). El crecimiento se determinó según la densidad óptica a 595 nm a diferentes tiempos después de la inoculación.

2.6.2. Sensibilidad del mutante $\Delta con7-1$ a factores de estrés abiótico.

El crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en presencia de diversos agentes abióticos de estrés, como son BCIP, un indicador de la lisis hifal; los agentes de estrés oxidativo menadiona y cafeína; los compuestos que producen estrés osmótico NaCl y sorbitol; y los compuestos que interaccionan con la membrana plasmática (SDS y α -tomatina) y con la pared fúngica (rojo congo y blanco de calcoflúor), se determinó tras la inoculación de 10^6 esporas en medio SM conteniendo cada uno de estos compuestos y su posterior incubación a 28 °C durante 3 días.(Figura 48).

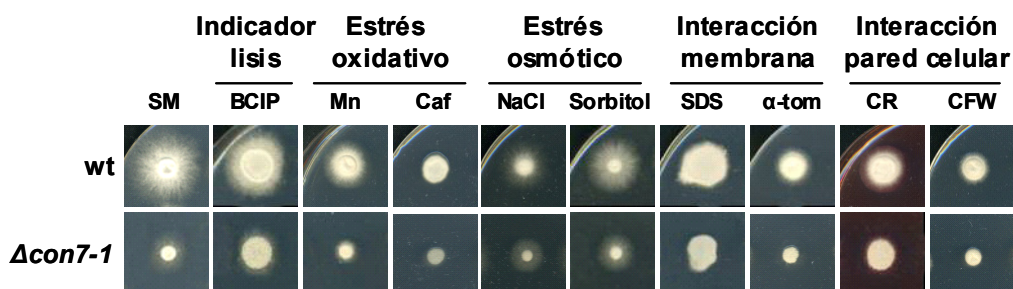


Figura 48. Crecimiento de la estirpe silvestre (wt) y del mutante $\Delta con7-1$ en presencia de 60 $\mu\text{g/ml}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP); 10 $\mu\text{g/ml}$ de menadiona (Mn); 7.5 mM de cafeína (Caf); 0.6 M de NaCl; 1.2 M de sorbitol; 0.025 % de SDS; 0.25 mM de α -tomatina (α -tom); 25 $\mu\text{g/ml}$ de rojo congo (CR) y 20 $\mu\text{g/ml}$ de blanco de calcoflúor (CFW).

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en medio conteniendo agentes de estrés en comparación con la ausencia de los mismos, excepto cuando se cultivó en presencia de BCIP, SDS o rojo congo (CR), donde se observó mayor crecimiento en comparación con la colonia originada en ausencia de estos compuestos (Figura 48).

2.6.3. Crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ en diferentes fuentes de carbono

Para determinar si el mutante $\Delta con7-1$ está afectado en la utilización de diversas fuentes de carbono, se inocularon 5×10^4 esporas de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta con7-1$ en medio mínimo sólido con las siguientes fuentes de carbono: monosacáridos, como la arabinosa o la galactosa; disacáridos, como la celobiosa, la lactosa, la maltosa, o la sacarosa; azúcares complejos como el ácido poligalacturónico (PGA); alcoholes derivados de azúcares como el manitol o el sorbitol; y aminoácidos como la glicina, el glutámico o la prolina; y se incubaron a 28 °C durante 7 días, tras los cuales se midió el diámetro de las colonias (Figura 49).

Los resultados indican que el mutante $\Delta con7-1$ muestra una reducción de su crecimiento de aproximadamente un 30% con respecto a la

estirpe silvestre en la mayoría de los medios analizados. Sin embargo, la reducción del crecimiento de la estirpe mutante alcanzó un 50% cuando el medio contenía ácido poligalacturónico o glicina como fuente de carbono, mientras que la reducción del crecimiento del mutante solo llegó al 10% en presencia de galactosa como fuente de carbono (Figura 49).

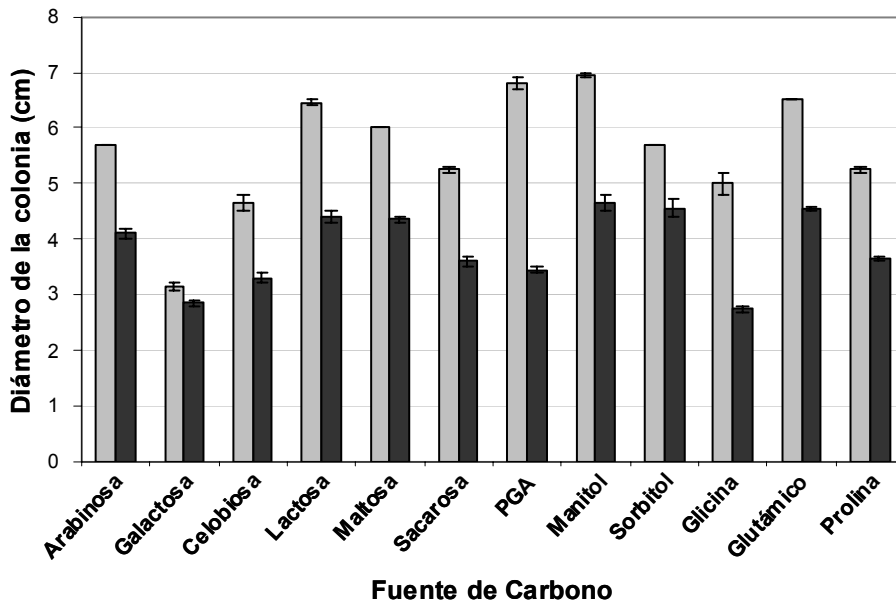


Figura 49. Diámetro de la colonia (cm) generada por la estirpe silvestre (barra gris) o por la estirpe mutante $\Delta con7-1$ (barra negra) en medio mínimo SM conteniendo diferentes fuentes de carbono, después de 7 días de crecimiento a 28 °C. Las barras indican el error estándar de dos experimentos independientes.

2.7. Expresión de genes relacionados con pared en los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$

Para analizar si en *F. oxysporum*, como ocurre en *M. grisea*, la expresión de genes de biogénesis de pared y de morfogénesis está regulada por el factor de transcripción Con7, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR a tiempo final usando como molde ARN aislado de germínulas de la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta con7-1$ y $\Delta con7-2\Delta con7-3$ tras 14 horas de crecimiento en medio PDB. El análisis incluyó varios genes sintasa de quitina (*chs*), un gen que determina una proteína de unión a quitina de función desconocida (*cbp2*), un gen sintasa de glucano (*fks1*), un gen β -1,3-

glucanosil transferasa (*gas1*) y un gen que determina un componente del polarisoma (*spa1*). Los genes *chs6* y *cbp2* de *F. oxysporum* son ortólogos a los genes *chs7* y *cbp2*, respectivamente, que están regulados por el factor de transcripción Con7p de *M. grisea* (Figura 50).

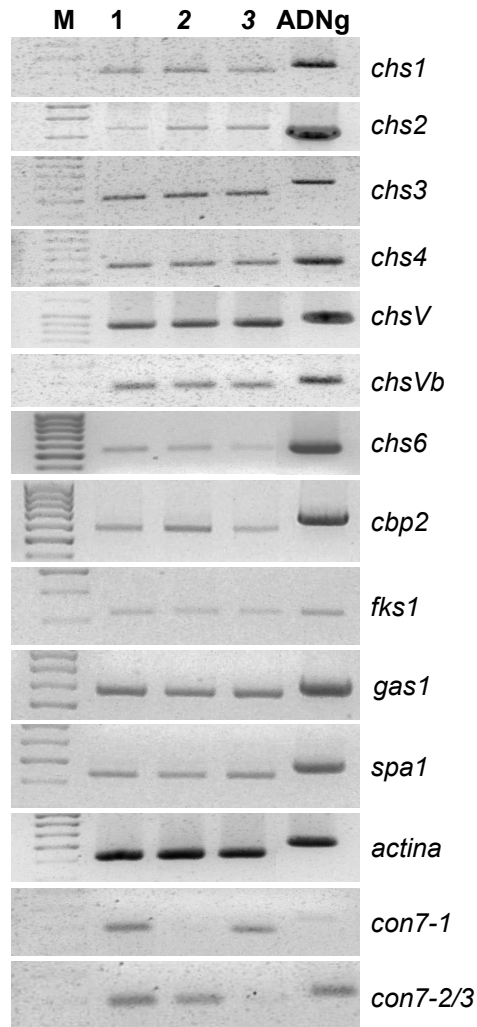


Figura 50. Expresión de genes relacionados con la biosíntesis de pared y la morfología celular mediante RT-PCR a tiempo final, en la estirpe silvestre (1), el mutante $\Delta con7-1$ (2) y el mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ (3), en medio PDB durante 14 horas. El gen actina fue usado como control interno. La amplificación de los ADN_s genómicos se utilizó como control positivo de la PCR.

En primer lugar se comprobó la expresión de los genes *con7-1* y *con7-2/3* en la estirpe silvestre en las condiciones del ensayo. Como era de esperar, los genes *con7* no se expresaban en los mutantes respectivos,

confirmando su anulación funcional. Tampoco se observó un efecto compensatorio entre los genes *con7* en cada mutante. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados entre las distintas estirpes.

3. Discusión

Tanto el desarrollo morfológico como la patogénesis fúngica son procesos bien regulados cuyas bases moleculares no se conocen en profundidad. En este contexto, el gen *con7*, descrito previamente en *M. grisea*, parece jugar un papel relevante para ambos procesos (Shi y Leung, 1995; Odenbach *et al.*, 2007).

Secuencias ortólogas a *con7* están presentes en el genoma de todos los euascomicetos secuenciados hasta el momento, entre ellos *F. oxysporum*, pero están ausentes en levaduras (Odenbach *et al.*, 2007). Ello sugiere que las proteínas determinadas por este gen regulan procesos esenciales en hongos filamentosos, que no existen en levaduras. El genoma de *F. oxysporum* contiene tres copias del gen *con7*, *con7-1*, *con7-2* y *con7-3*, con una homología del 44.5% entre el primero y los otros dos, idénticos entre sí. Las proteínas Con7 de *F. oxysporum* presentan motivos conservados a Con7 de *M. grisea*, incluyendo una región señal de localización nuclear, el dominio de unión a ADN del tipo dedo de zinc, una región “coiled-coil” y una región rica en los aminoácidos prolina y glutamina, lo que indica su papel esencial en la regulación génica. La región “coiled-coil” sugiere que las proteínas Con7 deben interactuar entre sí o con otras proteínas para ejercer su función. De hecho, la mayoría de los factores de transcripción del tipo dedo de zinc contiene más de un dominio de unión al ADN. Por otro lado, la secuencia peptídica deducida de *con7-1*, revela la presencia de varios sitios de fosforilación posibles, lo que, junto a la existencia de una región rica en prolina y glutamina, y la posible interacción con otras proteínas, sugiere que la actividad de Con7-1 de *F. oxysporum* está altamente regulada, al igual que en *M. grisea*.

Odenbach y colaboradores (2007) también han descrito que existen al menos dos versiones distintas del ARN mensajero del gen *con7* en *M. grisea*, que se procesa diferencialmente en los distintos estadios del desarrollo del hongo. El procesamiento diferencial de intrones detectado en el ARN del gen *con7-1* de *F. oxysporum* afecta a la región 5' del transcrito primario, sin alterar la región de los dominios de localización nuclear, unión a ADN, "coiled-coil" y la región rica en prolina y glutamina. Ello debe originar distintas versiones de proteínas Con7-1, que difieren tan solo en su extremo amino, y que, de acuerdo a su secuencia, algún/os sitios de fosforilación únicos para cada versión. Esto sugiere que cada versión de la proteína podría estar diferencialmente regulada para desempeñar su función en un estadio concreto del desarrollo morfológico del hongo. Por otro lado, podría ocurrir que todas las versiones de la proteína interaccionaran entre sí para controlar la expresión génica. En este sentido, se considera de interés poder ampliar nuestra investigación para determinar si cada versión se regula diferencialmente a lo largo del desarrollo del hongo y las posibles interacciones con otras proteínas.

La anulación dirigida de los genes *con7* de *F. oxysporum* reveló su importancia en la patogénesis y morfogénesis fúngica. La interrupción de los genes *con7-2* y *con7-3*, idénticos entre sí, no resultó esencial para ninguno de estos procesos. El mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$ no mostró alteración en el desarrollo de la enfermedad ni en la invasión de frutos de tomate. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en el crecimiento de este mutante, ni en la regulación de varios genes relacionados con la biogénesis de pared y la morfología del hongo.

A diferencia del mutante $\Delta con7-2\Delta con7-3$, el mutante $\Delta con7-1$ mostró la pérdida completa de la patogenicidad en plantas de tomate, lo que demuestra su implicación en la patogénesis de *Fusarium*. Sin embargo, fue capaz de crecer en frutos de tomate, aunque mostrando menor proliferación de micelio que la estirpe silvestre. El hecho de que el mutante $\Delta con7-1$ sea capaz de invadir el interior de los frutos de tomate sugiere que el defecto para desarrollar la enfermedad podría deberse a una incapacidad para penetrar

las raíces, ya que los estudios de microscopía óptica demuestran que este mutante es capaz de adherirse a la superficie radicular y germinar sobre la misma. A pesar de que *F. oxysporum* no forma apresorios ni estructuras especializadas de infección, el gen *con7-1* podría regular algún proceso relacionado con la penetración de la planta.

Por otro lado, el retraso en el crecimiento del mutante $\Delta con7-1$ tanto en medio sólido como líquido, el hecho de su germinación preferentemente unipolar y la formación de colonias monospóricas con asimetría radial, así como los defectos observados en la ramificación y en la conidiación, sugieren que el gen *con7-1* está implicado en la regulación de la morfogénesis y el establecimiento de la polaridad celular. La reducción observada en la ramificación podría explicar el descenso en conidiación. Si el mutante $\Delta con7-1$ desarrolla menor número de ramificaciones, también podría formar un menor número de conidióforos. Esto podría estar relacionado a su vez con la colonización de la planta, ya que una reducción en la esporulación en el interior de la planta conllevaría una colonización ineficiente de los tejidos.

El desarrollo morfogénico requiere inevitablemente la modificación de la pared celular. Sin embargo, el mutante $\Delta con7-1$ no resultó más sensible a diversos agentes abióticos de estrés, que incluyen compuestos que interactúan con la membrana o la pared fúngica, lo que parece indicar que su defecto en el crecimiento no implica alteración estructural de los componentes de la pared. De acuerdo con esto, el defecto en su crecimiento no se remedia en presencia de un estabilizador osmótico como el sorbitol, como ocurre en otros mutantes de biogénesis de pared como $\Delta chsV$ y $\Delta chsVb$ (Madrid *et al.*, 2003, Martín-Urdíroz *et al.*, 2008). El mutante mostró un crecimiento ligeramente mayor cuando el medio contenía el indicador de la lisis hifal BCIP, el detergente que altera la integridad de las membranas SDS y el inhibidor del ensamblaje de las microfibrillas de glucano, congo red. Esto sugiere que la biogénesis de los componentes de la pared o la remodelación de la misma podría estar alterada en el mutante $\Delta con7-1$.

La reducción en la tasa de germinación en medio mínimo sugiere la posibilidad de que este gen esté implicado en la asimilación de nutrientes del medio. Además, la reducción del crecimiento del mutante con respecto a la estirpe silvestre, alrededor de un 30%, se hace más evidente (hasta un 50%) en medio conteniendo glicina y ácido poligalacturónico, un constituyente de la pared celular de plantas. Ello indica que el mutante $\Delta con7-1$ podría estar afectado en la asimilación de los nutrientes disponibles durante su interacción con el hospedador.

Ninguno de los genes relacionados con la síntesis de quitina y glucano analizados parecen estar regulados por el factor de transcripción Con7-1 en *F. oxysporum*. A diferencia de lo que ocurre con *M. grisea*, Con7-1 tampoco controla la expresión de los genes *chs6* y *cbp2*, ortólogos a *chs7* y *cbp2* de *M. grisea*, respectivamente, regulados por Con7p. De hecho, la inactivación del gen *chs7* de *M. grisea* resultó en mutantes afectados en la penetración de la planta (Odenbach *et al.*, 2009). Esto supone que, a pesar de que las proteínas Con7 de *M. grisea* y *F. oxysporum* regulan procesos generales de morfogénesis y patogénesis, no comparten las mismas dianas específicas. Tampoco se observó una regulación de la expresión de otros genes *chs*, como *chs2*, *chsV* y *chsVb*, cuya anulación en *F. oxysporum* ha originado estirpes afectadas en patogénesis (Madrid *et al.*, 2003; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004; 2008). El mismo resultado se observó para el gen *gas1*, también implicado en patogénesis (Caracuel *et al.*, 2005), y para el gen *spa*, que determina un componente del polarisoma esencial para el crecimiento polarizado en *Ashbya gossypii* (Knechtle *et al.*, 2003) y en *Aspergillus niger* (Meyer *et al.*, 2008).

En *F. oxysporum*, otros factores de transcripción importantes para la patogénesis han sido identificados, como los factores Fow2 de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Imazaki *et al.*, 2007); Sge1 de la formae specialis *lycopersici* (Michielse *et al.*, 2009) y Ftf1 de la forma specialis *phaseoli* (Ramos *et al.*, 2007). La anulación dirigida de los genes que determinan estos factores de transcripción resultó en la pérdida completa de la patogénesis, aunque los mutantes nulos no mostraron defectos morfológicos.

Los resultados de este trabajo indican que la proteína Con7-1 desempeña un papel esencial en la patogénesis y la morfogénesis de *F. oxysporum*, probablemente participando en el establecimiento de la polaridad y en la biogénesis o remodelación de la pared celular. Sería de máximo interés por tanto, identificar genes regulados por este factor de transcripción.

Conclusiones

1. El producto del gen *tom1* no es un factor esencial para la patogénesis, pero sí contribuye a la virulencia completa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate.

2. *F. oxysporum* contiene al menos cuatro genes con identidad elevada a la familia 3 de glicosil-hidrolasas, que podrían ser las responsables de la hidrólisis de la α -tomatina hasta β_2 -tomatina en la estirpe mutante $\Delta tom1$.

3. La estirpe mutante de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* $\Delta chsV$ coloniza los tejidos internos del tallo de las plantas de tomate 3 días después de la inoculación, pero su crecimiento disminuye a lo largo del tiempo.

4. La infección de plantas de tomate con la estirpe mutante de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* $\Delta chsV$ produce un adelanto de la expresión de los genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta *lin6*, *gluB*, *chi3*, *chi9* y *pr1*, y una mayor cantidad de actividad quitinasa.

5. La estirpe mutante de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* $\Delta chsV$ ejerce un efecto protector específico de la fusariosis causada por la estirpe silvestre 4287, debido a una competición entre ambas estirpes por los nutrientes en la rizosfera y/o la colonización de los tejidos internos de la planta, así como a una rápida elicitación de la defensa de la planta, que conduce a una restricción del crecimiento fúngico.

6. *F. oxysporum* contiene tres genes ortólogos al gen *con7* de *M. grisea*.

7. El gen *con7-1* de *F. oxysporum* presenta un procesamiento diferencial de intrones en el gen *con7-1* dando lugar a cuatro transcritos de distinto tamaño.

8. La proteína Con7-1 es esencial para la patogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aunque no necesaria para la adhesión a la superficie radicular.

9. El gen *con7-1* está implicado en la morfogénesis de *F. oxysporum*, contribuyendo significativamente al establecimiento de la polaridad celular y los procesos de ramificación y esporulación.

Bibliografía

- Agrios, G.N. (1997) Plant Pathology. San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc.
- Alabouvette C., Olivain, C., y Steinberg, C. (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114: 329-341.
- Armstrong, G.M., y Armstrong, J.K. (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*, P.E. Nelson, Tousson, T.A., and Cook, R.J., ed (University Park, PA, USA: State University Press), pp. 391-399.
- Arneson, P.A., y Durbin, R.D. (1967a). Hydrolysis of tomatine by *Septoria lycopersici* - a detoxification mechanism. *Phytopathology* 57: 1358-1360.
- Arneson, P.A., y Durbin, R.D. (1967b). Studies on the mode of action on tomatine as a fungitoxic agent. *Plant Physiology* 43: 683-686.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A., y 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.
- Ballio, A., Chain, E.B., De Leo, P., Erlanger, B.F., Mauri, M., y Tonolo, A. (1964) Fusicoccin: a new wiltring toxin produced by *Fusicoccum amygdali* Del. *Nature* 203: 297.
- Bartnicki-García, S. (1968) Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22: 87-108.
- Beckman, C.H. (1987) The nature of wilt diseases of plants. Minnesota, EEUU, APS Press.
- Bednarek, P., y Osbourn, A. (2009) Plant-Microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324: 746-748.
- Benhamou, N. (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 1:233-240.
- Benhamou, N., y Garand, C. (2001) Cytological analysis of defence-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology* 91: 730-740.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J., y Bloemberg, G.V. (2005) Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 710-721.
- Booth, C. (1971) The genus *Fusarium*. The Eastern Press limited London and Reading.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., y Osbourn, A. (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418: 889-892.

- Bowman, S.M., y Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28: 799-808.
- Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J., y Osbourn, A.E. (1995) Host-range of a plant-pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267: 371-374.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Calero-Nieto, F., Di Pietro, A., Roncero, M.I.G., y Hera, C. (2007) Role of the transcriptional activator XlnR of *Fusarium oxysporum* in regulation of Xylanase genes and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 977-985.
- Callow, J. A. (1987) Models for host-pathogen interactions. En *The applied mycology of Fusarium*. Ed., Cambridge University Press: 39-69.
- Cañero, D.C., y Roncero, M.I.G. (2008a) Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98: 509-518.
- Cañero, D.C., y Roncero, M.I.G. (2008b) Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* 154: 1474-1481.
- Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M.I.G., Di Pietro, A., y Ramos, J. (2003) pH response transcription factor PacC controls SALT stress tolerance and expression of the P-type Na⁺-ATPase *ena1* in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 2: 1246-1252.
- Caracuel, Z., Martínez-Rocha, A.L., Di Pietro, A., Madrid, M.P., y Roncero, M.I.G. (2005) *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative β -1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1140-1147.
- Carpita, N.C., y Gibeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Pressey, R., Darvill, G., y Albersheim, P. (1990) Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* 29: 447-449.
- Côté, F., y Hahn, M. (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- Cuomo, C.A., Güldener, U., Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Di Pietro, A., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., DeCaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Hammond-Kosack, K., Harris, L.J., Hilburn, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Münsterkötter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Ouellet, T., Qi, W., Quesnesville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V. Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., y Kistler, H.C. *The Fusarium*

- graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. (2007) *Science* 317: 1400-1402.
- Czymmek, K.J., Fogg, M., Powell, D.H., Sweigard, J., Park, S.Y., 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.
- Daboussi, M.J., y Capy, P. (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* 57: 275-299.
- Dalisay, R.F., y Kuc, J.A. (1995) Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 315-327.
- Danhash, N., Wagemakers, C.A., van Kan, J.A., y de Witt, P.J. (1993) Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Molecular Biology* 22: 1017-1029.
- Defago, G., y Kern, H. (1983) Induction of *Fusarium solani* mutants insensitive to tomatine, their pathogenicity and aggressiveness to tomato fruits and pea-plants. *Physiological Plant Pathology* 22: 29-37.
- de Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., y Beijersbergen, A.G. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16: 839-842.
- Dimmic, M.W., Rest, J.S., Mindell, D.P., y Goldstein, R.A. (2002) rtREV: an amino acid substitution matrix for inference of retrovirus and reverse transcriptase phylogeny. *Journal of Molecular Evolution* 55: 65-73.
- Di Pietro, A., y Roncero, M.I.G. (1998) Cloning, expresión, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 91-98.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Meglecz, E., y Roncero, M.I.G. (2001a) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* 39: 1140-1152.
- Di Pietro, A., Huertas-González, M.D., Gutierrez-Corona, J.F., Martínez-Cadena, G., Meglecz, E., y Roncero, M.I.G. (2001b) Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 653-662.
- Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., y Roncero, M.I.G. (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* 4: 315-326.
- Di Pietro, A., Roncero, M.I.G., y Ruiz-Roldán, M.C. (2009) From tools of survival to weapons of destruction: role of cell wall-degrading enzymes in plant infection. En *The Mycota V Plant Relationships*

- Second Edition (Deising H.B., ed.) Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 181-200.
- Divon, H.H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., y Fluhr, R. (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* patogénesis. *Molecular Plant Pathology* 7: 485-497.
- Dixon, R.A., y Lamb, C.J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology* 41: 339-367.
- Dixon, R.A., y Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., y Lemanceau, P., (1998) Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* 104: 903-910.
- Durbin, R.D., y Uchtyl, T.F. (1969). Purification and properties of a fungal β -glucosidase acting on α -tomatine. *Biochimica et Biophysica Acta* 191: 176-178.
- Duyvesteijn, R.G., van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B.J., y Haring, M.A. (2005) Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Molecular Microbiology* 57: 1051-1063.
- Ford, J.E., McCance, D.J., y Drysdale, R.B. (1977) Detoxification of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytochemistry* 16: 545-546.
- Fravel, D., Olivain, C., y Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.
- Freeman, S., y Rodríguez, R.J. (1993) Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260: 75-78.
- Freeman, S.O., Zveibil, A., Vintal, H., y Maymon, M. (2001) Isolation on nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* for biological control of *Fusarium* wilt in cucurbits. *Phytopathology* 92: 164-168.
- Fuchs, J.G., Moëgne-Loccoz, Y., y Défago, G. (1997) Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease* 81: 492-496.
- García-Maceira, F.I., Di Pietro, A., y Roncero, M.I.G. (2000) Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 359-365.
- García-Maceira, F.I., Di Pietro, A., Huertas-González, M.D., Ruiz-Roldán, M.C., y Roncero, M.I.G. (2001) Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during

- early stages of infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2191-2196.
- Gómez-Gómez, E., Roncero, M.I.G., Di Pietro, A., y Hera, C. (2001) Molecular characterization of a novel endo-beta-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 40: 268-275.
- Gómez-Gómez, E., Ruiz-Roldán, M.C., Di Pietro, A., Roncero, M.I.G., y Hera, C. (2002) Role in patogénesis of two endo-beta-1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 35: 213-222.
- Guindon, S., y Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Hammond-Kosack, K.E., y Jones, J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*.
- Heath, M.C. (1996) Plant resistance to fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18: 469-475.
- Hedley, P.E., Machray, G.C., Davies, H.V., Burch, L., y Waugh, R. (1994) Potato (*Solanum tuberosum*) invertase-encoding cDNAs and their differential expression. *Gene* 145: 211-214.
- Henrissat, B., y Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293: 781-788.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., y Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain-reaction. *Gene* 77: 51-59.
- Huertas-Gonzalez, M.D., Ruiz-Roldan, M.C., Di Pietro, A., y Roncero, M.I.G. (1999) Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 63-72.
- Huertas-González, M.D., Ruiz-Roldán, M.C., García-Maceira, F.I., Roncero, M.I.G., y Di Pietro, A. (1999) Cloning and characterization of *p11* encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 35: 36-40.
- Imazaki, I., Kurahashi, M., Iida, Y., 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.
- Inoue, I., Namiki, F., y Tsuge, T. (2002) Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. *Plant Cell* 14: 1869-1883.

- Ito, S., Takahara, H., Kawaguchi, T., Tanaka, S., y Kameya-Iwaki, M. (2002) Post-transcriptional silencing of the tomatinase gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 150: 474-480.
- Ito, S., Nagata, A., Kai, T., Takahara, H., y Tanaka, S. (2005) Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 183-191.
- Ito, S., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H., y Ikeda, T. (2004) Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters* 571: 31-34.
- Jackson, A.O., y Taylor, C.B. (1996) Plant-Microbe Interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8: 1651-1668.
- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T., y Takata, R. (2002) Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 41: 407-413.
- Jain, S., Akiyama, K., Kan, T., Ohguchi, T., y Takata, R. (2003) The G protein beta subunit FGB1 regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 43: 79-86.
- Jain, S., Akiyama, K., Takata, R., y Ohguchi, T. (2005) Signaling via the G protein alpha subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology Letters* 243: 165-172.
- Jonkers, W., Andrade Rodrigues, C.D., y Rep, M. (2009) Impaired colonization and infection of tomato roots by the $\Delta frp1$ mutant of *Fusarium oxysporum* correlates with reduced CWDE gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 507-518.
- Kaup, O., Grafen, I., Zellermann, E.M., Eichenlaub, R., y Gartemann, K.H. (2005) Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1090-1098.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G.I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., y Papadopoulou, K.K. (2007) Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* 58: 3853-3864.
- Kawabe, M., Mizutani, K., Yoshida, T., Teraoka, T., Yoneyama, K., Yamaguchi, I., y Arie, T. (2004) Cloning of the pathogenicity-related gene FPD1 in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 16-20.
- Kawabe, M., Yoshida, T., Teraoka, T., y Arie, T. (2006) FCD1 encoding protein homologous to cellobiose: quinone oxidoreductase in *Fusarium oxysporum*. *Gene* 382: 100-110.

- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., y McLnerney, J.O. (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* 6: 29.
- Kers, J.A., Cameron, K.D., Joshi, M.V., Bukhalid, R.A., Morello, J.E., Wach, M.J., Gibson, D.M., y Loria, R. (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* 55: 1025-1033.
- Keukens, E.A.J., Devrije, T., Fabrie, C., Demel, R.A., Jongen, W.M.F., and Dekruiff, B. (1992) Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta* 1110: 127-136.
- Keukens, E.A.J., deVrije, T., vandenBoom, C., deWaard, P., Plasman, H.H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W.M.F., and deKruiff, B. (1995) Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1240: 216-228.
- Knechtle, P., Dietrich, F., y Philippsen, P. (2003) Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4140-4154.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., y Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. β -1,6-glucan interconnects mannoprotein, β -1,3-glucan, and chitin. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 17762-17775.
- Lairini, k., Pérez-Espinosa, A., Pineda, M., y Ruiz-Rubio, M. (1996) Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1604-1609.
- Lairini, K., y Ruiz-Rubio, M. (1998) Detoxification of α -tomatine by *Fusarium solani*. *Mycological Research* 102: 1375-1380.
- Lairini, K., Perez-Espinosa, A., y Ruiz-Rubio, M. (1997) Tomatinase induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 37-52.
- Lamb, C., y Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Larkin, R.P., y Fravel, D.R. (1999) Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89: 1152-1161.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A., De Kogel, W.J., Alabouvette, C., y Schippers, B. (1993) Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudobactin* 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 74-82.

- Li Destri Nicosia, M.G., Brocard-Masson, C., Demais, S., Hua Van, A., Daboussi, M.J., y Scazzocchio, C. (2001) Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 39: 1330-1344.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C_t$) method. *Methods* 25: 402-408.
- López-Berges, M., Di Pietro, A., Daboussi, M.J., Abdel Wahab, H., Vasnier, C., Roncero, M.I.G., Dufresne, M., y Hera, C. (2009). Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Molecular Plant Pathology* 10: 95-107.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, C., Yoder, O.C., y Turgeon, G. (1994) Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *PNAS USA* 91: 12649-12653.
- Madrid M.P., Di Pietro, A., y Roncero, M.I.G. (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, M.J., Julien, J., Roussel, F., Scazzochio, C., y 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-Hernandez, A.M., Dufresne, M., Hugouvieux, V., Melton, R., y Osbourn, A. (2000) Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1301-1311.
- Martín-Urdíroz, M. (2008) Caracterización genética de la síntesis de quitina en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: relación con el proceso de patogénesis. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Martín-Urdíroz, M., Madrid, M., y Roncero, M.I.G. (2004) Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150: 3175-3187.
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M.I.G., González-Reyes, J.A. y Ruíz-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, A.L., Roncero, M.I.G., López-Ramírez, A., Marine, M., Guarro, J., Martínez-Cadena, G., y 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.E., Punt, P.J., y van den Hondel, D.A. (1988) A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 25.

- Matthews, D.E., y Van Etten, H.D. (1983) Detoxification of the phytoalexin pisatin by a fungal cytochrome P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 224: 494-505.
- Melton, R.E., Flegg, L.M., Brown, J.K.M., Oliver, R.P., Daniels, M.J., y Osbourn, A.E. (1998) Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 228-236.
- Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodríguez-Jurado, D., y Jiménez-Díaz, R.M. (2003) Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 91-105.
- Meyer, V., Arentshorst, M., van den Hondel, C.A.M.J.J., y Ram, A.F.J. (2008) The polarisome component SpaA localises to hyphal tips of *Aspergillus niger* and its important for polar growth. *Fungal Genetics and Biology* 45: 152-164.
- Michielse, C.B., y Rep. M. (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10: 311-324.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B.J., y Rep, M. (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biology* 10: R4.
- Mitchell, P.J., y Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Morrissey, J.P., y Osbourn, A.E. (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708.
- Moss, M.O., y Smith, J.E. (1984) *The applied mycology of Fusarium*. Cambridge, British Mycological Society.
- Mullaney, E.J., Hamer, J.E., Roberti, K.A., Yelton, M.M., y Timberlake, W.E. (1985) Primary structure of the *trpc* gene from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 199: 37-45.
- Murray, M.G., y Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y., y Tsuge, T. (2001) Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 580-584.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S.,

- Farman, M., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., García, J.L., García, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwillian, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafton, A., Latge, J.P., Li, W.X., Lord, A., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Peñalva, M.A., Perteua, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., de Córdoba, S.R., Rodríguez-Peña, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sánchez, M., Sánchez-Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., de Aldana, C.R.V., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., y Denning, D.W. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438: 1151-1156.
- Odenbach, D., Breth, B., Thines, E., Weber, R.W.S., Anke, H., y Foster, A.J. (2007) The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology* 64: 293-307.
- Odenbach, D., Thines, E., Anke, H., y Foster, A.J. (2009) The *Magnaporthe grisea* class VII chitin synthase is required for normal appressorial development and function. *Molecular Plant Pathology* 10: 81-94.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., y Ploetz, R.C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *PNAS USA* 95: 2044-2049.
- Ohara, T., y Tsuge, T. (2004) FoSTUA, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kind of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 3: 1412-1422.
- Ohara, T., Inoue, I., Namiki, F., Kunoh, H., y Tsuge, T. (2004) REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* 166: 113-124.
- Oka, K., Okubo, A., Kodama, M., y Otani, H. (2006) Detoxification of α -tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola* and its role in infection. *Journal of General Plant Pathology* 72: 152-158.
- Olivain, C., y 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., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatechi, J., L'Haridon, F., y Alabouvette, C. (2006) Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1523-1531.
- Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M.N., Cordier, C., Pugin, A., y Alabouvette, C. (2003) Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5453-5462.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Mayayo, E., y 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, A.E., Clarke, B.R., Lunness, P., Scott, P.R., y Daniels, M.J. (1994) An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 457-467.
- Osborn, A., Bowyer, P., Lunness, P., Clarke, B., y Daniels, M. (1995) Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 971-978.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Ospina-Giraldo, M.D., Mullins, E., y Kang, S. (2003) Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Current Genetics* 44: 49-57.
- Page, R.D.M. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Panina, Y., Fravel, D.R., Baker, C.J., y Shcherbakova, L.A. (2007) Biocontrol and plant pathogenic *Fusarium oxysporum*-induced changes in phenolic compounds in tomato leaves and roots. *Journal of Phytopathology* 155: 475-481.
- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M.I.G., y Ruiz-Roldán, M.C. (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 728-736.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Powell, W.A., y Kistler, H.C. (1990) In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *Journal of Bacteriology* 172: 3163-3171.

- Prados-Rosales, R.C., y Di Pietro, A. (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7: 162-171.
- Prusky, D., y Keen, N.T. (1993) Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease* 77: 114-119.
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Kuyvenhoven, A., Soede, R.D.M., Pouwels, P.H., y Vandenhondel, C. (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpa* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* 93: 101-109.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., y van den Hondel, C.A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124.
- Quidde, T., Osbourn, A.E., y Tudzynski, P. (1998) Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 151-165.
- Quidde, T., Buttner, P., y Tudzynski, P. (1999) Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *European Journal of Plant Pathology* 105: 273-283.
- Ramos, B., Alves-Santos, F.M., García-Sdnehez, M.A., Martín-Rodrigues, N., Eslava, A.P., y Díaz-Minguez, J.M. (2007) The gene coding for a new transcription factor (*ffl*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genetics and Biology* 44: 864-876.
- Redman, R.S., Ranson, J.C., y Rodríguez, R.J. (1999a) Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 969-975.
- Redman, R.S., Freeman, S., Clifton, D.R., Morrel, J., Brown, G., y Rodríguez, R.J. (1999b) Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiology* 119: 795-804.
- Rep, M. van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., y Cornelissen, B.J.C. (2005) 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.
- Rocha, A.L.M., Di Pietro, A., Ruiz-Roldán, C., y Roncero, M.I.G. (2008) Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum*, is dispensable for virulence. *Molecular Plant Pathology* 9: 293-304.
- Roddick, J.G. (1977) Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 16: 805-807.

- Roddick, J.G. (1979) Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols *in vitro*. *Phytochemistry* 18: 1467-1470.
- Rodríguez-Gálvez, E., y Mendgen, K. (1995) The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189: 61-72.
- Roldán-Arjona, T., Perez-Espinosa, A., y Ruiz-Rubio, M. (1999) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 852-861.
- Ruiz-Roldán, C., Puerto-Galán, L., Roa, J., Castro, A., Di Pietro, A., Roncero, M.I.G., y Hera, C. (2008) The *Fusarium oxysporum sti35* gene functions in thiamine biosynthesis and oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology* 45: 6-16.
- Ruiz-Roldán, M.C., Garre, V., Guarro, J., Marine, M., y Roncero, M.I.G. (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7: 1227-1230.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th edn.
- Sandrock, R.W., DellaPenna, D., y VanEtten, H.D. (1995) Purification and characterization of β_2 -tomatinase, an enzyme involved in the degradation of α -tomatine and isolation of the gene encoding β_2 -tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 960-970.
- Sandrock, R.W., y VanEtten, H.D. (1998) Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin α -tomatine. *Phytopathology* 88: 137-143.
- Sandrock, R.W., y Vanetten, H.D. (2001) The relevance of tomatinase activity in pathogens of tomato: disruption of the β_2 -tomatinase gene in *Colletotrichum coccodes* and *Septoria lycopersici* and heterologous expression of the *Septoria lycopersici* β_2 -tomatinase in *Nectria haematococca*, a pathogen of tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 159-171.
- Schoffmeier, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H., y Cornelissen, B.J.C. (1999) The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27: 275-282.
- Schönbeck, F., y Schlösser, E. (1976) Preformed substances as potential protectants. En *Physiological Plant Pathology*, R. Heitefuss and P.H. Williams, eds (Berlin: Springer-Verlag), pp. 653-678.
- Shi, Z., y Leung, H. (1995) Genetic análisis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 949-959.
- Shi, Z., Christian, D., y Leung, H. (1998) Interactions between spore morphogenetic mutations affect cell types, sporulation, and

- pathogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 199-207.
- Shih M.C., Heinrich, P., y Goodman, H.M. (1991) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 104: 133-138.
- Soulie, M.C., Perino, C., Piffeteau, A., Choquer, M., Malfatti, P., Cimerman, A., Kunz, C., Boccara, M. y Vidal-Cros, A. (2006) *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cellular Microbiology* 8: 1310-1321.
- Stab, M.R., y Ebel, J. (1987) Effects of Ca²⁺ on phytoalexin induced by fungal elicitors in soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 257: 416-423.
- Steel, C.C., y Drysdale, R.B. (1988) Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by α -tomatine. *Phytochemistry* 27: 1025-1030.
- Suleman, P., Tohamy, A.M., Saleh, A.A., Madkour, M.A., y Straney, D.C. (1996). Variation in sensitivity to tomatine and rishitin among isolates of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, and strains not pathogenic on tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 131-144.
- Teunissen, H.A., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J., y Haring, M.A. (2002) Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 298-310.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994). Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Torres, A.M., Weeden, N.F., y Martin, A. (1993) Linkage among isozyme, RFLP and rapd markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 937-945.
- Vanetten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., y Farmer, E.E. (1994) 2 Classes of plant antibiotics - phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6: 1191-1192.
- Vanetten, H., Temporini, E., y Wasmann, C. (2001) Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 83-93.
- van Kan, A., Joosten, M.H., Wagemakers, C.A., van den Berg-Velthuis, G.C. y de Witt, P.J. (1992) Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513-527.

- Van Loon, L.C., y Van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., y Bodey, G.P. (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clinical Infection Diseases* 17 Suppl 2: S487-S491.
- Wanjiru, W.M., Zhensheng, K., y Buchenauer, H. (2002) Importance for cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803-810.
- Wattad, C., Freeman, S., Dinoor, A., y Prusky, D. (1995) A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 621-626.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E. y Steinberg, G. (2006) Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 225-242.
- Weltring, K.M., Wessels, J., y Pauli, G.F. (1998) Metabolism of the tomato saponin α -tomatine by *Gibberella pulicaris*. *Phytochemistry* 48: 1321-1328.
- Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G. y Deising H.B. (2007) A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1555-1567.
- Zhang, Y., y Smith, D.A. (1983) Concurrent metabolism of the phytoalexins phaseollin, kievitone and phaseollinisoflavan by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Physiological Plant Pathology* 23: 89-100.

Publicaciones

Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants

Yolanda Pareja-Jaime, M. Isabel G. Roncero, and M. Carmen Ruiz-Roldán

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Edificio Gregor Mendel, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

Submitted 14 January 2008. Accepted 3 March 2008.

Saponin detoxification enzymes from pathogenic fungi are involved in the infection process of their host plants. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a tomato pathogen, produces the tomatinase enzyme Tom1, which degrades α -tomatine to less toxic derivatives. To study the role of the *tom1* gene in the virulence of *F. oxysporum*, we performed targeted disruption and overexpression of the gene. The infection process of tomato plants inoculated with transformants constitutively producing Tom1 resulted in an increase of symptom development. By contrast, tomato plants infected with the knockout mutants showed a delay in the disease process, indicating that Tom1, although not essential for pathogenicity, is required for the full virulence of *F. oxysporum*. Total tomatinase activity in the disrupted strains was reduced only 25%, leading to β_2 -tomatine as the main hydrolysis product of the saponin in vitro. In silico analysis of the *F. oxysporum* genome revealed the existence of four additional putative tomatinase genes with identities to tomatinases from family 3 of glycosyl hydrolases. These might be responsible for the remaining tomatinase activity in the $\Delta tom1$ mutants. Our results indicate that detoxification of α -tomatine in *F. oxysporum* is carried out by several tomatinase activities, suggesting the importance of these enzymes during the infection process.

Additional keywords: fungal pathogen, saponins.

Plants produce, as a consequence of their normal metabolism, a set of secondary metabolites with antimicrobial properties that have been classified as phytoanticipins (Vanetten et al. 1994). Therefore, plant pathogens must combat these compounds in order to perform a successful interaction. Tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) produce the antifungal compound α -tomatine, a steroidal glycoalkaloid consisting of an aglycone moiety (tomatidine) and an oligosaccharide moiety (β -lycotetraose) composed of four sugars (one molecule of galactose, one of xylose, and two of glucose), considered to be a saponin. The molecule is present in roots, stems, leaves, and green fruit, reaching concentrations up to 1 mM in some areas (Roddick 1977). Similarly to other saponins, the toxic effect of α -tomatine is attributed to its ability to form complexes with the 3β -hydroxy sterols of the fungal membrane, causing pores and leakage of the cellular content (Keukens et al. 1992, 1995; Roddick 1979).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* is a soilborne pathogen that causes vascular wilt disease on tomato plants (Di Pietro et al. 2003). During the infection process, the fungus copes with

inhibitory levels of the saponin. Tomato pathogens are less sensitive to α -tomatine than those nonpathogenic on this plant species (Arneson and Durbin 1967a and b; Steel and Drysdale 1988; Suleman et al. 1996); therefore, these microbes must display mechanisms to circumvent the effects of the molecule (Morrissey and Osbourn 1999; Osbourn 1996; Vanetten et al. 2001). Some pathogens tolerate saponins through passive mechanisms such as lacking sterols in their cell membranes, resulting in an inability to cause electrolyte leakage (Arneson and Durbin 1967a and b; Defago and Kern 1983; Keukens et al. 1992). Others produce specific enzymes, collectively designated tomatinases, that remove at least one sugar from the tetrasaccharide moiety, which seems to be sufficient to detoxify the molecule. This is the case of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, which expresses at least one extracellular protein with tomatinase activity (Ford et al. 1977; Roldan-Arjona et al. 1999). Tomatinases have been identified in other tomato pathogens, such as *Septoria lycopersici* (Arneson and Durbin 1967a and b; Durbin and Uchtyl 1969), *Verticillium albo-atrum* (Sandrock and VanEtten 1998), *Botrytis cinerea* (Quidde et al. 1998), *F. solani* (Lairini and Ruiz-Rubio 1998), or *Alternaria solani* (Schönbeck and Schlösser 1976); however, they differ in their mechanism of action and seem to belong to different protein families. Whereas tomatinases from *S. lycopersici* and *V. albo-atrum*, both members of family 3 of β -glycosyl hydrolases, remove the β -1,2-linked glucose to produce β_2 -tomatine (Sandrock and VanEtten 1998), *B. cinerea* seems to catalyze the hydrolysis of the β -1,3-xylose to release β_1 -tomatine (Quidde et al. 1998). In contrast, tomatinase from *A. solani* degrades the saponin to tomatidine by releasing the four monosaccharide (Schönbeck and Schlösser 1976). Tomatinase from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, which belongs to family 10 of β -glycosyl hydrolases, cleaves the β -1-galactose, releasing the entire oligosaccharide chain and tomatidine (Roldan-Arjona et al. 1999). Several tomatinases belonging to family 10 of glycosyl hydrolases have been reported in the weak tomato pathogen *Gibberella pulicaris* (Weltring et al. 1998) and in the pathogenic bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Kaup et al. 2005) and *Streptomyces turgidiscabies* (Kers et al. 2005). The role of saponinases in fungal pathogenicity to plants remains controversial. Detoxification of saponins has been associated with pathogenicity, although this has been clearly confirmed only for the interaction between *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* and oat plants (Bowyer et al. 1995). Targeted disrupted mutants deficient in avenacinase activity from *G. graminis* var. *avenae* revealed that the enzyme was essential for pathogenicity to oat (Bowyer et al. 1995). Despite this finding, tomatinase deficient mutants from *Septoria lycopersici* (Martin-Hernandez et al. 2000) and from *Colletotrichum coccodes* (Sandrock and Vanetten 2001) showed unaltered virulent phenotypes. On the other hand, het-

Corresponding author: Carmen Ruiz-Roldán; Telephone: +34 957218981; Fax: +34 957212072; E-mail: ge2rurom@uco.es

erologous expression of the tomatinase gene from *S. lycopersici* in the nontomatinae-producing pathogens *Cladosporium fulvum* and *Nectria haematococca* resulted in increased sporulation rates on tomato plants (Melton et al. 1998; Sandrock and Vanetten 2001), thus demonstrating their implication in virulence. It also has been reported that tomatinases might play a role in suppression of fundamental disease resistance processes (Bouarab et al. 2002; Ito et al. 2004; Martin-Hernandez et al. 2000), being present and expressed even in nonpathogens of tomato during symptomless infection of the plant (Ito et al. 2005; Lairini et al. 1997). Recently, in a failed attempt to disrupt the tomatinase gene from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, partially silenced transformants of this gene showed reduced virulence, revealing a possible role of tomatinase from *F. oxysporum* in pathogenicity (Ito et al. 2002).

The aim of this report is to clarify the role of the tomatinase gene *tom1* (Roldan-Arjona et al. 1999) in the pathogenic behavior of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. We have generated fungal strains of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* that do not express the Tom1 enzyme through targeted gene disruption, as well as a strain that constitutively expresses Tom1. Our results indicate that tomatinase contributes to virulence of this fungal species on tomato plants.

RESULTS

Targeted disruption and overexpression of the *tom1* gene in the wild-type strain.

To determine the function of the *tom1* gene (Roldan-Arjona et al. 1999), mutants carrying a disrupted copy of the gene were generated by gene replacement. A linear fragment con-

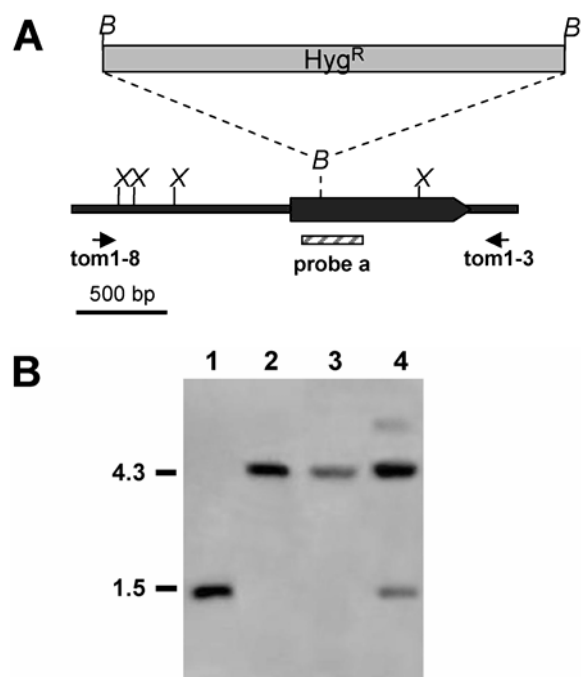


Fig. 1. Targeted disruption of the *Fusarium oxysporum tom1* gene. **A**, Restriction map of the genomic region and gene disruption vector. The *tom1* coding region is shown as a black arrow indicating the orientation of the open reading frame. Small arrows indicate the primers used for polymerase chain reaction amplification of the gene disruption vector. The hygromycin resistance (Hyg^R) cassette is indicated by a gray box. Restriction enzymes are X = *XhoI* and B = *BamHI*. **B**, Southern analysis of *Fusarium* strains: lane 1, wild-type strain; lanes 2 and 3, $\Delta\text{tom1}\#1$ and $\Delta\text{tom1}\#2$ transformants; and lane 4, ectopic integration transformant no. 9. DNAs were *XhoI* digested and hybridized with the indicated probe. Size markers are in kilobases.

taining an internal region of the *tom1* allele interrupted by the hygromycin resistance (Hyg^R) cassette (Fig. 1A) was introduced into protoplasts of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* wild-type strain 4287. Hyg^R selection allowed the isolation of 131 transformants which initially were screened by polymerase chain reaction (PCR) amplification and analysis of the pattern consistent with homologous replacement of the *tom1* gene. According to PCR analysis, only eight transformants showed amplification bands consistent with the disrupted *tom1* allele (named transformants no. 1 to 8) (data not shown). The homologous recombination events in transformants no. 1 and 2 were confirmed by Southern analysis using an internal fragment of the *tom1* coding region as a probe (Fig. 1B, probe a). The wild-type strain showed a 1.5-kb *XhoI* hybridizing fragment corresponding to the *tom1* allele (Fig. 1B). This fragment was replaced by a 4.3-kb band in transformants that had undergone disruption of the tomatinase gene (Fig. 1B). Transformant #9 displayed the original 1.5-kb *XhoI* band and additional hybridizing fragments, indicating ectopic insertions of the disrupted allele (Fig. 1B).

F. oxysporum strains carrying a constitutively overexpressed *tom1^C* allele were produced by fusing the *tom1* coding region to the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter (*PgpdA*) (Fig. 2A). The entire construct was amplified by PCR and introduced into protoplasts of the wild-type strain by co-transformation together with the phleomycin resistance (Phleo^r) cassette. A number of Phleo^r transformants were selected, and the presence of the complete *tom1^C* allele was confirmed by Southern analysis using an internal *tom1* gene fragment as a probe (Fig. 2B, probe b). The presence of the wild-type allele (2 kb) was detected in the wild-type strain as well as in all the analyzed transformants. One additional hybridizing band was observed in each transformant consistent with the ectopic insertion of the *tom1^C* construct into the genome (Fig. 2B).

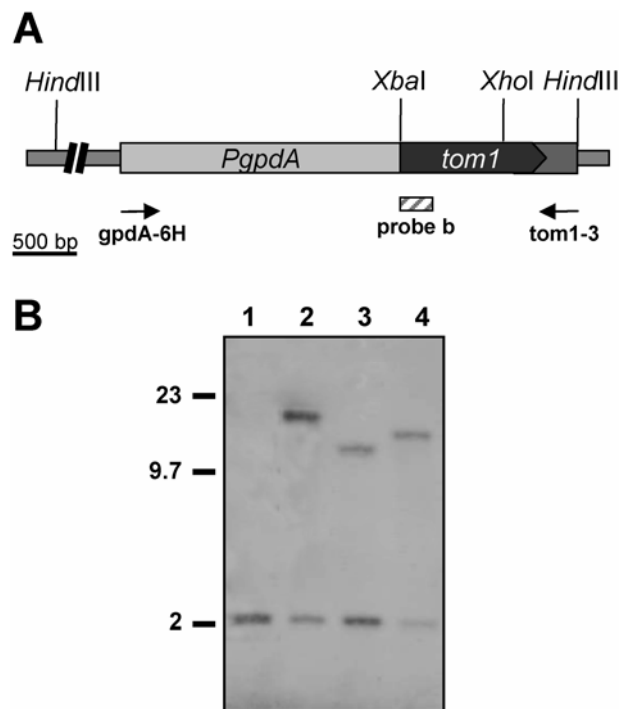


Fig. 2. Overexpression of the *tom1* gene. **A**, Physical map of the overexpression vector. The *tom1* gene is shown as a black arrow fused to the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter. Small arrows indicate the primers used for polymerase chain reaction amplification. **B**, Southern analysis of lane 1, the wild-type strain; and lanes 2, 3, and 4, three different *tom1^C* transformants. Genomic DNAs were digested with *HindIII* and hybridized with the indicated probe. Size markers are in kilobases.

Northern analysis was used to confirm the absence of *tom1* transcripts in the knockout mutants and its overexpression in the *tom1^C* strains (Fig. 3). It has been reported that the *tom1* gene is induced by α -tomatine (Roldan-Arjona et al. 1999). Total RNA obtained from mycelia of the different strains grown for 3 h in the absence or presence of α -tomatine at 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was hybridized to an antisense *tom1* probe amplified with primer tom1-16 (Table 1). The *tom1* transcripts were detected only in the wild-type strain grown in the presence of α -tomatine (Fig. 3), whereas no signal was detected in the knockout mutants in any condition. By contrast, in the constitutive *tom1^C#1* transformant, *tom1* transcription was independent of the presence of α -tomatine. One transformant harboring an ectopic insertion of the disruption construct showed the same expression pattern as the wild-type strain. These results confirmed that transformants no. 1 and 2 were targeted mutants lacking a functional copy of the *tom1* gene, whereas transformant *tom1^C#1* constitutively transcribed the *tom1* gene.

Tomatinase activity in $\Delta tom1$ and *tom1^C* transformants.

The effect of the disruption or the overexpression of the *tom1* gene on total extracellular tomatinase activity from *F. oxysporum* was determined. Total protein was extracted from culture filtrates by acetone precipitation from the different strains grown for 48 h in liquid CA (casamino acids) in the absence or presence of α -tomatine. Tomatinase activity was assayed by visualizing the presence of reducing sugars spectrophotometrically at 525 nm with the dinitrosalicylic acid reagent (DNS) (Fig. 4). As expected, the wild-type strain showed a significant increase in the levels of tomatinase activity under inducing conditions, whereas no significant activity was observed in the absence of α -tomatine. A reduction of approximately 25% in tomatinase activity was detected in the filtrates of the disrupted mutants $\Delta tom1\#1$ and $\Delta tom1\#2$ in the presence of α -tomatine compared with the wild-type strain. By contrast, high levels of activity were observed in filtrates from the constitutive *tom1^C* transformants independently of the presence of α -tomatine in the culture medium.

The degradation products of α -tomatine produced by the different strains were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) under both inducing and noninducing conditions (Fig. 5). The analysis revealed culture filtrates from the wild-type strain

grown in the presence of α -tomatine caused the hydrolysis of the saponin and showed the appearance of two degradation products: a major spot corresponding to tomatidine and a minor one, which may correspond to β_2 -tomatine. This second spot was the only degradation product obtained from the induced crude extract of the disrupted strains, suggesting that α -tomatine was degraded to β_2 -tomatine by these mutant extracts, whereas tomatidine was the only product released by crude extracts from the constitutive transformants under either inducing or noninducing conditions, probably because the high amount of the Tom1 enzyme in these strains favors the degradation of the α -tomatine to tomatidine.

Sensitivity of $\Delta tom1$ mutants to α -tomatine.

The abilities to grow on agar medium containing α -tomatine shown by two targeted mutants, $\Delta tom1\#1$ and $\Delta tom1\#2$, and by the constitutive *tom1^C#1* transformant, were compared with the wild-type strain (Fig. 6A). The differences were quantified by measuring the colony diameters and the halos surrounding them (Fig. 6B). No differences between strains were observed in the absence of α -tomatine. Both the wild-type strain and the *tom1^C* mutant showed approximately 35% growth inhibition (GI) on plates containing 0.5 mM α -tomatine compared with their growth in its absence (Fig. 6A and C). By contrast, the

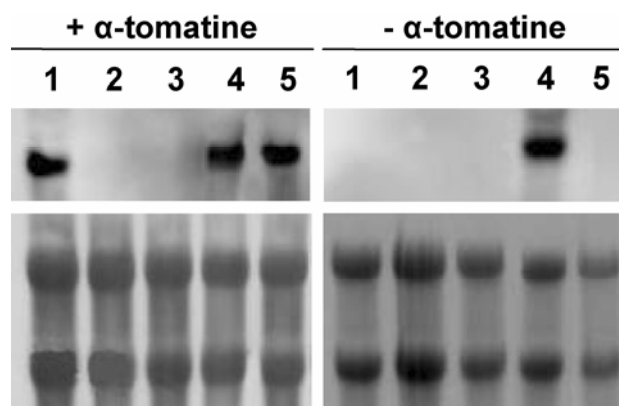


Fig. 3. Expression analysis of the *tom1* gene. Upper panels, Northern analysis of total RNA extracted from mycelia grown in the presence (+) or absence (-) of α -tomatine using a *tom1* antisense probe. Lane 1, wild-type strain; lanes 2 and 3, $\Delta tom1\#1$ and $\Delta tom1\#2$ transformants; lane 4, *tom1^C* transformant; lane 5, an ectopic integration transformant. The lower panels show RNAs stained with methylene blue.

Table 1. Oligonucleotides used in this study

| Name | Sequence ^a |
|-----------|--------------------------------------|
| tom1-X1 | cttagaatgaaggccaactatcatcatcg |
| tom1-3 | cttggcactggaatgaaagtc |
| tom1-5B | tgggttacaggatcctgagataag |
| tom1-8 | gctgacccagacaggctgc |
| tom1-9B | actgagagaggatccggccaagaa |
| tom1-10B | ttcttgccggatcctctctcagt |
| tom1-11X | ctcgagctcaagcagtcaaaatccct |
| tom1-12H | aagcttcgacgagttgtgctaccatct |
| tom1-16 | aacatcaaggcctcgcctcc |
| tom2-1 | ccactctgcgacactgcta |
| tom2-2 | ctgtgttctctgttcgtttcc |
| tom3-1 | ctatcattggtcttgcctggt |
| tom3-2 | tgttgaggatactgcgtcta |
| tom4-1 | ateccccctatcctccccc |
| tom4-2 | aagagactccagaatgcgttg |
| tom5-1 | tgtgttgctctcgggtctttt |
| tom5-2 | tagtctcctccatcgaatac |
| gpdA-6H | aagcttcagttcatggcggtt |
| gpd-2k | cagcgactggatcctcca |
| trpter-2k | gattaccttaaacaaagggtacc |
| act-1 | atgaccagatcgctctcgag |
| act-2 | gagggaccgcctcgtcgt |

^a Restriction sites introduced in the original sequences are shown in bold.

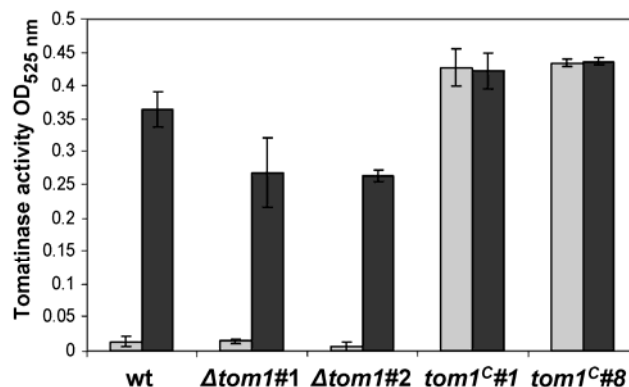


Fig. 4. Total tomatinase activity from *Fusarium oxysporum* strains, measured using protein extracts from culture medium from the different strains grown in the absence (gray bars) or presence (black bars) of α -tomatine. Tomatinase activity is expressed as the absorbance at 525 nm of the reaction mixture. Each column represents the mean of three independent experiments, and the standard error bars are indicated.

knockout mutants showed 50% GI on 0.5 mM α -tomatine. The appearance of a translucent halo surrounding the colonies was evidenced when strains were grown in the presence of α -tomatine, which might be a consequence of the saponin hydrolysis. The ratio halo/colony diameter was similar in the wild-type strain and the $\Delta tom1$ mutants, despite the fact that $\Delta tom1\#1$

and $\Delta tom1\#2$ colonies were always smaller. By contrast, this value was higher in the constitutive $tom1^C$ transformant. Similar results were observed when strains were grown on 0.1 or 1 mM α -tomatine (data not shown).

Pathotypic behavior of $\Delta tom1$ and $tom1^C$ transformants on tomato.

The role of the $tom1$ gene in virulence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was determined by plant infection assays, performed by immersing the roots of 2-week-old tomato plants in microconidial suspensions of the wild-type strain, the deficient $\Delta tom1$ mutants, or the constitutive $tom1^C$ transformants. Plants were scored for vascular wilt symptoms at different time intervals after inoculation (Fig. 7). Severity of wilt symptoms in plants inoculated with the wild-type strain increased steadily throughout the experiment, and most of the plants were dead 20 days after inoculation. Plants inoculated with the $\Delta tom1$ mutants showed a significant delay in symptom development compared with the wild-type strain, with most of the plants dead 25 days after inoculation. By contrast, $tom1^C$ transformants showed a significant increase in symptom development, because most of the plants were dead 15 days after inoculation (Fig. 7). Virulence experiments were performed three times with similar results.

Identification of additional tomatinase genes in the *F. oxysporum* genome.

The genome of *F. oxysporum* was explored in silico to further investigate the existence of additional tomatinase-encoding genes. No genes showing high similarity to $tom1$ (Roldan-Arjona et al. 1999) were found, whereas at least four genes encoding proteins with putative tomatinase activity were identified.

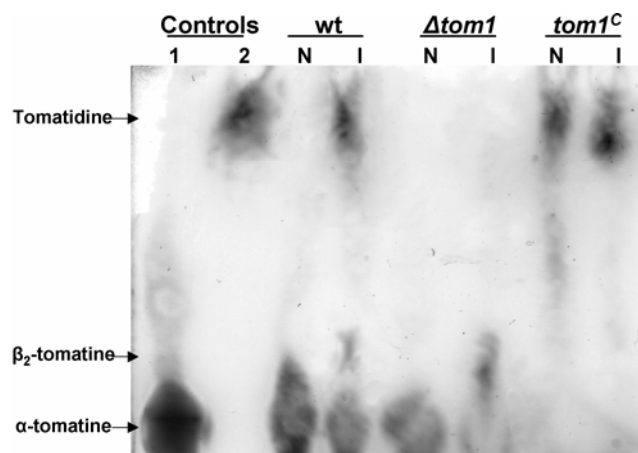


Fig. 5. Thin-layer chromatography analysis of tomatinase reaction products. Tomatine (5 mM) was incubated overnight at room temperature with noninduced (N) or induced (I) crude extracts from the wild type (wt), disrupted $\Delta tom1\#1$, and constitutive $tom1^C\#1$ strains. α -Tomatine and tomatidine were loaded in lanes 1 and 2, respectively, and used as markers. The assay was repeated twice with similar results. Figure shows the results from a representative experiment.

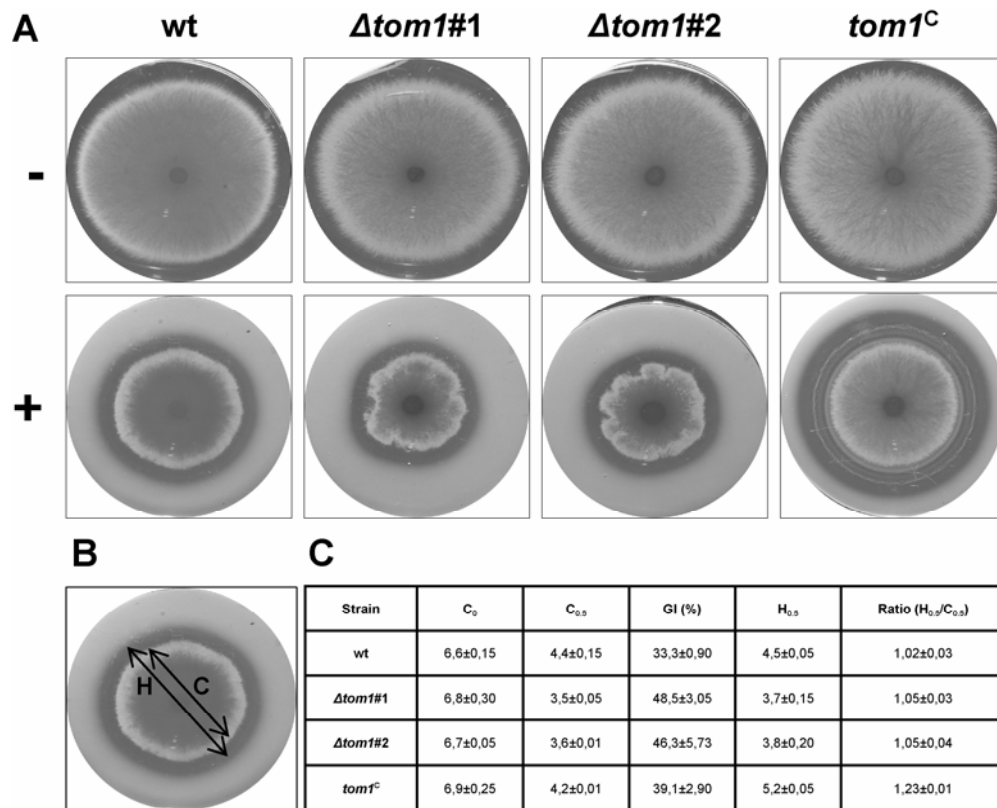


Fig. 6. Effect of α -tomatine on *Fusarium oxysporum* growth. **A**, Wild-type strain (wt), two disrupted transformants $\Delta tom1\#1$ and $\Delta tom1\#2$, and a constitutive transformant ($tom1^C$) grown onto solid CA (casamino acid) medium in the absence (-) or presence (+) of 0.5 mM α -tomatine for 7 days. **B**, Diameter of the colonies in the presence of 0.5 mM α -tomatine (C) and of the surrounding halos (H). **C**, Measurement of the colony diameter (cm) in the absence of α -tomatine (C_0), in the presence of 0.5 mM α -tomatine ($C_{0.5}$), and the halos surrounding them ($H_{0.5}$). Growth inhibition (GI) indicates the percentage of growth inhibition for each strain ($C_{0.5}$ values compared with C_0). Ratio ($H_{0.5}/C_{0.5}$) represents the relation between halo size and colony size observed for each strain in the presence of α -tomatine.

tified showing identity to the β_2 -tomatinase from *S. lycopersici* (Durbin and Uchytel 1969; Osbourn et al. 1995; Sandrock et al. 1995). These genes were named *tom2* (FOXG_09849), *tom3* (FOXG_02734), *tom4* (FOXG_13018), and *tom5* (FOXG_09125). The deduced amino acid sequences of these genes presented high identity degrees with family 3 glycosyl hydrolases: 51.8% identity between Tom2 and *B. cinerea sap1* avenacinase, 53.5% between Tom3 and *S. lycopersici* tomatinase, 50.0% identity between Tom4 and *G. graminis* avenacinase, and 56.8% identity was found between Tom5 and *G. graminis* avenacinase. To establish the relationship between these proteins, the amino acid sequence from *F. oxysporum* tomatinases was aligned together with *S. lycopersici* β_2 -tomatinase (Osbourn et al. 1995; Sandrock et al. 1995), *G. graminis* avenacinase (Bowyer et al. 1995), *B. cinerea sap1* avenacinase (Quide et al. 1999), *A. fumigatus* glycosyl hydrolase family protein (Nierman et al. 2005), *Streptomyces turgidiscabies* tomatinase (Kers et al. 2005), and *Clavibacter michiganensis* tomatinase (Kaup et al. 2005) (data not shown). The resulting phylogenetic tree demonstrated that *F. oxysporum* tomatinases cluster into two different groups: Tom1 belongs to family 10

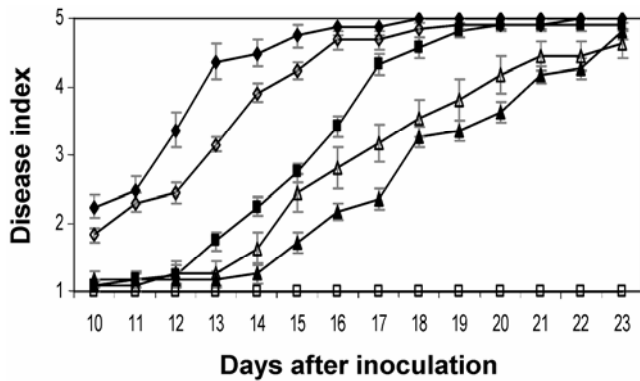


Fig. 7. Virulence of *Fusarium oxysporum* strains on tomato. Wilt disease incidence of the different strains on tomato plants (cv. Monika). Severity of disease symptoms was recorded at different times after inoculation, using an index ranging from 1 (healthy plant) to 5 (dead plant). Symbols refer to plants inoculated with the wild-type strain (■), $\Delta tom1\#1$ transformant (Δ), $\Delta tom1\#2$ transformant (▲), constitutive *tom1^C*#1 transformant (◆), constitutive *tom1^C*#8 transformant (◇), and the uninoculated control (□). Error bars indicate the standard deviations from 15 plants for each treatment. The data shown are from one representative experiment.



Fig. 8. Phylogenetic relationship between tomatinases from *Fusarium oxysporum*. Phylogram of a consensus phylogenetic tree obtained by maximum likelihood method of *F. oxysporum* predicted tomatinases Tom1, Tom2, Tom3, Tom4, and Tom5; β_2 -tomatinase from *Septoria lycopersici* (Sltom) (AAB08446); avenacinase from *Gaeumannomyces graminis* (Ggave) (AAA63146); tomatinase from *Streptomyces turgidiscabies* (Sttom) (AAW49296); tomatinase from *Clavibacter michiganensis* (Cmtom) (YP_001220829); a glycosyl hydrosase family protein from *Aspergillus fumigatus* (AfgH) (XP_751064); and avenacinase from *Botrytis cinerea* (Bcsap1) (CAB61489). Amino acid sequences were aligned using clustal W. Numbers at the branch points represent the bootstrap value based on 1,000 replicates. A scale bar indicating the genetic distance (substitutions per site) is shown.

glycosyl hydrolases, whereas Tom2, Tom3, Tom4, and Tom5 are members of family 3 glycosyl hydrolases (Fig. 8).

Reverse-transcription (RT)-PCR analysis using specific primers for each gene was performed in order to determine the expression pattern of tomatinase genes in the wild-type, $\Delta tom1$, and *tom1^C* strains grown in the absence or presence of α -tomatine. In order to discriminate the amplicons obtained from genomic DNA, primer pairs were designed located within exons of the corresponding gene, except for the *tom1* gene, which lacks intron sequences. The results indicated low expression levels of *tom2* and *tom5* in comparison with *tom1* gene, while expression of *tom3* and *tom4* was not detected in any condition (Fig. 9). Expression of *tom2* gene appeared to be induced by α -

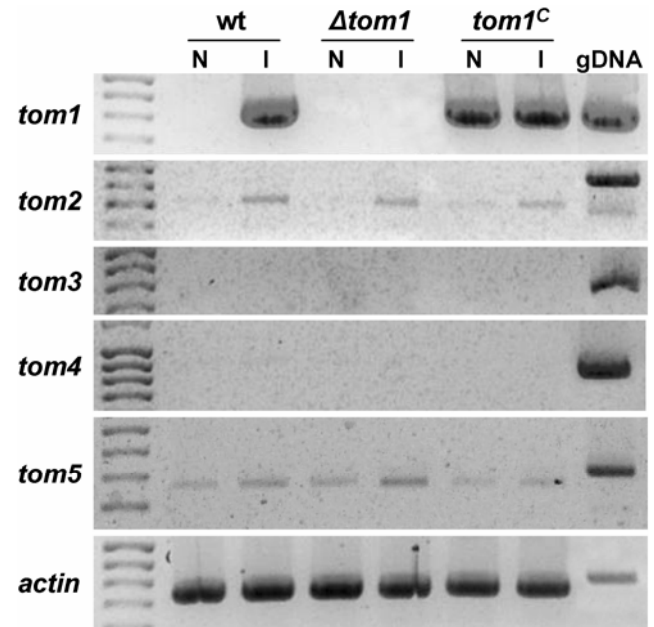


Fig. 9. Expression analysis of the *tom1*, *tom2*, and *tom5* genes by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Transcript levels of the predicted tomatinase genes *tom1*, *tom2*, and *tom5* were determined by RT-PCR in the wild-type strain (wt), disrupted $\Delta tom1$ transformant, and a constitutive *tom1^C* mutant, grown in the absence (N) or presence (I) of α -tomatine. The actin gene was used as an internal control. Amplification of genomic DNA (gDNA) was used as positive PCR control.

tomatine, whereas expression of *tom5* was independent of the presence of the saponin in the culture medium. Inactivation or overexpression of the *tom1* gene did not alter the expression pattern of any of the genes. Expression of the *tom1* gene, also included in this analysis, showed a pattern similar to that in the Northern expression analysis.

DISCUSSION

The infection process of pathogenic fungi into plants involves a confrontation between two mechanisms: the attack of the pathogen and the plant defense response. Among the tomato plant defense weapons is the production of the saponin α -tomatine, which is detoxified by a tomatinase enzyme secreted by the pathogen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lairini et al. 1996). This protein, encoded by the *tom1* gene, degrades the α -tomatine, releasing tomatidine and the tetrasaccharide β -lycotetraose (Lairini et al. 1996; Roldan-Arjona et al. 1999).

Detoxification of plant saponins is considered to be a virulence determinant for pathogenic fungi and, therefore, several efforts have been made to establish the importance of saponinases in pathogenicity. Interestingly, an attempt to disrupt the *tom1* gene in *F. oxysporum* resulted in the isolation of partial post-transcriptional silenced transformants with reduced pathogenicity on tomato plants (Ito et al. 2002). However, the authors could not conclude whether the *tom1* gene played an essential role in pathogenicity. Here, we report the effects of the targeted disruption and overexpression of the *tom1* gene in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Northern analysis of the constitutive *tom1^C* strains reveals the presence of *tom1* transcripts under both inducing and non-inducing conditions, confirming the overexpression of this gene. In agreement with this, tomatinase activity in *tom1^C* transformants was shown to be independent of the presence of α -tomatine in the culture medium. By contrast, although *tom1* transcripts were absent in Δ *tom1* mutants grown in the presence of the saponin, confirming *tom1* gene inactivation, a reduction of only 25% in the total tomatinase activity level was detected compared with the wild-type strain.

Further characterization of Δ *tom1* and *tom1^C* transformants revealed increased growth inhibition of the disrupted strains on solid media containing α -tomatine, whereas no changes were observed in the constitutive transformants compared with the wild-type strain. These results indicate higher sensitivity to α -tomatine displayed by the Δ *tom1* transformants due to the reduction in total tomatinase activity. However, comparable degradation halos surrounding the colonies were observed in the presence of high concentrations of the saponin for the Δ *tom1* and the wild-type strain, whereas the halos in the constitutive *tom1^C* transformants were significantly larger, suggesting a stronger hydrolytic activity of α -tomatine displayed by these transformants as a consequence of the overexpression of the *tom1* gene.

Pathogenicity tests on tomato plants indicated that *tom1* disruption produces a delay in the progression of the disease symptoms compared with the wild-type strain, whereas the overexpression of the *tom1* gene results in a faster development of the symptoms. These results suggest that, although the *tom1* gene is not an essential factor, it does contribute to full virulence of *F. oxysporum* on tomato plants.

Taken together, all these observations (the high tomatinase activity remaining in the Δ *tom1* strains, the similar degradation halo produced by the Δ *tom1* and the wild-type strains, and the reduced virulence of Δ *tom1*) suggest that additional enzyme activities present in *F. oxysporum* might be contributing to the detoxification of the α -tomatine, thus playing redundant functions. In silico analysis of the recently released complete ge-

nome sequence of *F. oxysporum* revealed the existence of at least five independent tomatinase-encoding genes: the *tom1* gene which detoxifies the molecule into tomatidine and β -lycotetraose and belongs to family 10 of glycosyl hydrolases (Roldan-Arjona et al. 1999), and four additional genes with high identity to the avenacinase gene from *G. graminis* and the β_2 -tomatinase gene from *Septoria lycopersici*, which belong to family 3 of glycosyl hydrolases (Henrissat and Bairoch 1993; Osbourn et al. 1995). We speculate that the proteins encoded by these four genes might be responsible for the remaining tomatinase activity and the degradation halos displayed by the Δ *tom1* strains, in spite of the low expression levels of these genes. This hypothesis is supported by the results obtained from the TLC analysis of tomatine degradation products released by induced crude extracts from Δ *tom1* mutants where β_2 -tomatine was the only detectable hydrolysis product, confirming the degradation of α -tomatine by additional enzymes with a mechanism of action different from Tom1.

The existence of various genes encoding for tomatinase enzymes has been proposed previously in the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes* (Sandrock and Vanetten 2001), where mutants lacking a functional copy of a β_2 -tomatinase gene still were able to degrade α -tomatine to tomatidine. In the fungal pathogen *B. cinerea*, at least three different saponin-degrading enzymatic activities have been described: *sap1* that detoxifies the avenacin, another one active on the digitonine and on the α -tomatine, and a third one proposed as an avenacosidase (Quidde et al. 1999). The existence of five different tomatinase genes in the genome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* supports the idea that detoxification of α -tomatine plays an important role during the infection of tomato plants. In *S. lycopersici*, mutants deficient in a β_2 -tomatinase gene showed no changes in pathogenicity (Martin-Hernandez et al. 2000). The authors proposed that additional nondegradative mechanisms of resistance to α -tomatine might exist, because no other hydrolysis products of the saponin were detected in the knockout mutants. Additionally, *tomA* genes, orthologous to *F. oxysporum tom1*, recently have been targeted inactivated in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in the plant-pathogenic bacteria *Streptomyces turgidiscabies*, although the resulting mutants were not reduced in virulence (Kaup et al. 2005; Kers et al. 2005). By contrast, disruption of the avenacinase-encoding gene in the cereal-infecting fungus *G. graminis* var. *avenae* revealed that detoxification of avenacin A-1 is a determinant of host range (Bowyer et al. 1995; Osbourn et al. 1994). A similar role has been proposed for *B. cinerea* and *Corynespora cassicola* tomatinases, where nonpathogenic strains lack the corresponding tomatinase-encoding genes (Oka et al. 2006; Quidde et al. 1998). On the other hand, heterologous expression of the *Septoria lycopersici* β_2 -tomatinase gene in *N. haematococca* and *Cladosporium fulvum* strains unable to degrade α -tomatine resulted in acquisition of the capacity to infect green tomato fruit and increase sporulation and infection extension on cotyledons, respectively (Melton et al. 1998; Sandrock and Vanetten 2001).

We conclude that, in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, detoxification of α -tomatine plays an essential role during the infection of tomato plants, likely being the result of the combined action of different tomatinase activities. Therefore, simultaneous inactivation of the five tomatinase-encoding genes present in the genome of *F. oxysporum* would clarify this hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates and culture conditions.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* wild-type strain 4287 (race 2) was obtained from J. Tello, Universidad de Almería, Spain, and

stored at -80°C with 30% glycerol as a microconidial suspension. The pathotype of the strain was confirmed periodically by plant infection assays. For DNA extraction and microconidia production, cultures were grown in potato dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit) at 28°C with shaking at 170 rpm during 3 days as described previously (Di Pietro and Roncero 1998). For expression analysis, 5×10^8 microconidia from each strain were grown with shaking for 12 h at 28°C in 50 ml of CA medium (CA at 10 g/liter, 10 mM ammonium sulfate, and yeast nitrogen base at 0.5 g/liter) before the addition of α -tomatine at $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Extrasynthèse, Genay, France), dissolved in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5, and followed by additional incubation for 3 h. The mycelia then were collected by filtration through nylon cloth (Monodur, mesh size 10 μm), washed with sterile water, and stored at -80°C . For tomatinase activity determination and TLC analysis, 2.5×10^6 microconidia were grown with shaking for 48 h at 28°C in 5 ml of CA medium containing α -tomatine at $30 \mu\text{g ml}^{-1}$, previously dissolved in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. The cultures were filtered to separate mycelia and spores, and the supernatants were used to determine the tomatinase activity or the degradation products in TLC analysis.

Nucleic acid isolation and analysis.

Genomic DNA was extracted from fungal mycelia as described previously (Aljanabi and Martinez 1997). DNA was treated with the corresponding restriction enzyme and subjected to Southern analysis as described in standard protocols (Sambrook et al. 1989) with the nonisotopic digoxigenin-labeling kit (Roche Diagnostics SL). Probe labeling was carried out as previously reported (Di Pietro and Roncero 1998) using the primers tom1-11X and tom1-12H (Table 1) for probe a or tom1-X1 and tom1-5B (Table 1) for probe b. Total RNA was isolated from powdered mycelia using Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics SL, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's recommendations, except for all incubation steps that were developed on ice. Total RNA (20 μg) was separated on a formaldehyde-1% agarose gel and transferred to positively charged Nylon membranes (Roche Diagnostics SL) by capillarity. For quantification, the transferred RNA was stained for 5 min in 0.02% methylene blue in 0.3 M sodium acetate, pH 5.2. After destaining in 20% ethanol, the filters were subjected to Northern analysis with the nonisotopic digoxigenin-labeling kit. Probe labeling was carried out as previously reported (Di Pietro and Roncero 1998) using the antisense primer tom1-16 (Table 1).

Construction of plasmid vectors and fungal transformation.

Gene replacement vector pDtom1 was constructed as follows. A *Bam*HI site was introduced at position 90 of the *tom1* coding region, using the overlapping method (Sambrook et al. 1989) with the primers tom1-9B and tom1-10B (Table 1), and the final product was cloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI, U.S.A.). A 2.75-kb *Bam*HI fragment containing the hygromycin B resistance gene under the control of an *A. nidulans* *gpdA* promoter (Punt et al. 1990) and *trpC* terminator (Mullaney et al. 1985) (*Hyg*^r cassette) was introduced at the new *Bam*HI site in the *tom1* coding region. A linear fragment containing the interrupted *tom1* allele was amplified with primers tom1-8 and tom1-3 (Table 1) and used to transform protoplasts of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain 4287, according to a protocol described previously (Di Pietro and Roncero 1998; Kistler and Benny 1988). *Hyg*^r transformants routinely were subjected to two consecutive rounds of single sporing and stored as microconidia at -80°C . To generate a highly expressed allele of *tom1*, the coding region of the gene

was fused to the strong constitutive *A. nidulans* *gpdA* promoter (Punt et al. 1990) as follows. A 1.16-kb fragment containing the complete open reading frame (ORF) of *tom1* was amplified by PCR from *F. oxysporum* genomic DNA, using primers tom1-X1 and tom1-3 (Table 1), and cloned into pGEM-T to generate plasmid ptomX. An *Xba*I-*Spe*I fragment containing the *tom1* ORF then was isolated from plasmid and cloned in frame with the *gpdA* promoter contained in plasmid pPgpdA. The complete fusion construct was amplified with primers *gpdA*-6H and tom1-3 (Table 1) and used to co-transform protoplasts of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain 4287 together with a 3-kb PCR fragment containing the *Phleo*^r amplified from the plasmid pAN8-1 with the primers *gpd*-2k and *trp*ter-2k (Table 1).

Tomatinase activity assays.

Proteins contained in supernatants obtained from induced cultures were concentrated by acetone precipitation and resuspended in sterile water. Tomatinase activity was measured spectrophotometrically at 525 nm with the DNS for determination of reducing sugars (Miller 1959). A 200- μl volume from a reaction mixture containing 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), α -tomatine at 2 mg ml^{-1} , and 6.5 μg of total protein was incubated overnight at room temperature. Reaction mixtures containing α -tomatine-free buffer and protein extracts were used as control. After incubation, 200 μl of 3,5-dinitrosalicylic acid solution was added, the mixture was boiled for 5 min, and the final volume was brought to 1 ml with water. Negative controls were prepared with protein extracts incubated in the absence of α -tomatine.

TLC analysis.

Supernatants obtained from culture filtrates from the different strains grown in the absence or presence of α -tomatine were incubated overnight with 5 mM α -tomatine in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at room temperature. Incubation mixtures were vacuum-dried, resuspended into an appropriate volume of methanol, and separated on Silica Gel 25 TLC plates. The plates were developed in a solvent system consisting of acetic acid, ethyl acetate, methanol, and water (10:30:20:1, by volume). Spots were visualized after TLC plates were sprayed with 50% sulphuric acid and heated at 110°C . The metabolites were identified by comparison with standards (α -tomatine and tomatidine, both 5 mM) which were treated in the same way as the incubation mixtures. α -Tomatine appeared as a black spot near the origin, whereas tomatidine was localized as a dark green spot near the solvent front.

α -Tomatine sensitivity tests.

For phenotypic analysis of colonies, fungal strains were grown on plates of CA medium containing agar at 20 g/liter, pH 7, supplemented with different concentrations of α -tomatine previously dissolved in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). Aliquots of 2.5×10^6 freshly obtained microconidia were transferred to the center of each plate and incubated at 28°C for 7 days. Growth was examined by measurement of the colony diameter and the halo surrounding it.

Pathogenicity assays.

Infection of tomato plants was performed as reported previously (Di Pietro and Roncero 1998). Briefly, 2-week-old tomato seedlings were inoculated with *F. oxysporum* strains by immersing the roots in a suspension of 5×10^6 microconidia ml^{-1} for 30 min, then planted in vermiculite and maintained in a growth chamber. Fifteen plants were used for each treatment. Severity of disease symptoms was recorded at different times after inoculation using an index ranging from 1 (healthy plant)

to 5 (dead plant) (Huertas-Gonzalez et al. 1999). Virulence experiments were performed three times with similar results. Seed from tomato cv. Monika were kindly provided by Novartis Seeds.

Identification of additional tomatinase genes in the *F. oxysporum* genome.

Genes showing identity to tomatinases belonging to family 3 of β -glycosyl hydrolases were searched in the *F. oxysporum* genome database available at the Broad Institute database using the blast algorithm (Altschul et al. 1990). Clustal-W analysis was used to compare amino acid sequences of these genes.

Phylogenetic analysis.

Amino acid sequences were aligned with the CLUSTAL W algorithm (Thompson et al. 1994). The phylml v2.4.4 program (Guindon and Gascuel 2003) was used to perform a 1,000-nonparametric bootstrap phylogenetic analysis of the resulting alignment with the maximum likelihood method after optimization of the settings by the modelgenerator v84 program (Keane et al. 2006). The analysis was performed using the WAG substitution model (Goldman and Whelan 2000) with a gamma distribution parameter α of 3.19. The phylogenetic relationships between sequences were depicted in a phylogenetic tree constructed using the TreeView v1.6.6 program (Page 1996).

RT-PCR.

Total RNA isolated from the different strains was treated with RNase-free DNase (Roche Diagnostics SL) and subjected to reverse transcription into cDNA with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen SA, San Diego, CA, U.S.A.) using a poli-dT antisense primer. The cDNA then was used for PCR amplification using the Expand High-Fidelity PCR System (Roche Diagnostics SL) with the primers tom2-1 and tom2-2 for *tom2*, tom3-1 and tom3-2 for *tom3*, tom4-1 and tom4-2 for *tom4*, tom5-1 and tom5-2 for *tom5*, or tom1-11X and tom1-12H for *tom1* (Table 1). The actin gene was used as the internal control using the primers act-1 and act-2 (Table 1).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (BIO2004-0276) and Junta de Andalucía (CVI-138). Y. Pareja-Jamie was supported by a fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. We thank N. Rispaíl for valuable help with phylogenetic analysis, A. Di Pietro for helpful discussions, and E. Martínez for technical assistance (all from the University of Córdoba).

LITERATURE CITED

Aljanabi, S. M., and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25:4692-4693.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Arneson, P. A., and Durbin, R. D. 1967a. Hydrolysis of tomatine by *Septoria lycopersici*: A detoxification mechanism. *Phytopathology* 57:1358-1360.

Arneson, P. A., and Durbin, R. D. 1967b. Studies on the mode of action on tomatine as a fungitoxic agent. *Plant Physiol.* 43:683-686.

Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., and Osbourn, A. 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418:889-892.

Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M. J., and Osbourn, A. E. 1995. Host-range of a plant-pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267:371-374.

Defago, G., and Kern, H. 1983. Induction of *Fusarium solani* mutants insensitive to tomatine, their pathogenicity and aggressiveness to tomato fruits and pea-plants. *Physiol. Plant Pathol.* 22:29-37.

Di Pietro, A., and Roncero, M. I. G. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular endopolygalactur-

ronase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:91-98.

Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., and Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* 4:315-325.

Durbin, R. D., and Uchytíl, T. F. 1969. Purification and properties of a fungal β -glucosidase acting on α -tomatine. *Biochim. Biophys. Acta* 191:176-178.

Ford, J. E., McCance, D. J., and Drysdale, R. B. 1977. Detoxification of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytochemistry* 16:545-546.

Goldman, N., and Whelan, S. 2000. Statistical tests of gamma-distributed rate heterogeneity in models of sequence evolution in phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* 17:975-978.

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

Henrissat, B., and Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293:781-788.

Huertas-Gonzalez, M. D., Ruiz-Roldan, M. C., Di Pietro, A., and Roncero, M. I. G. 1999. Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54:63-72.

Ito, S., Takahara, H., Kawaguchi, T., Tanaka, S., and Kameya-Iwaki, M. 2002. Post-transcriptional silencing of the tomatinase gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Phytopathol.* 150:474-480.

Ito, S., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H., and Ikeda, T. 2004. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 571:31-34.

Ito, S., Nagata, A., Kai, T., Takahara, H., and Tanaka, S. 2005. Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66:183-191.

Kaup, O., Grafen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R., and Gartemann, K. H. 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomyces *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1090-1098.

Keane, T. M., Creevey, C. J., Pentony, M. M., Naughton, T. J., and McLnerney, J. O. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6:29.

Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., Gibson, D. M., and Loria, R. 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* 55:1025-1033.

Keukens, E. A. J., Devrije, T., Fabrie, C., Demel, R. A., Jongen, W. M. F., and Dekruiff, B. 1992. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1110:127-136.

Keukens, E. A. J., deVrije, T., vandenBoom, C., deWaard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W. M. F., and deKruiff, B. 1995. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1240:216-228.

Kistler, H. C., and Benny, U. K. 1988. Genetic-transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 13:145-149.

Lairini, K., and Ruiz-Rubio, M. 1998. Detoxification of α -tomatine by *Fusarium solani*. *Mycol. Res.* 102:1375-1380.

Lairini, K., Perez-Espinosa, A., Pineda, M., and RuizRubio, M. 1996. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1604-1609.

Lairini, K., Perez-Espinosa, A., and Ruiz-Rubio, M. 1997. Tomatinase induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:37-52.

Martin-Hernandez, A. M., Dufresne, M., Hougouvioux, V., Melton, R., and Osbourn, A. 2000. Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1301-1311.

Melton, R. E., Flegg, L. M., Brown, J. K. M., Oliver, R. P., Daniels, M. J., and Osbourn, A. E. 1998. Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: Effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:228-236.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.

Morrissey, J. P., and Osbourn, A. E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:708.

Mullaney, E. J., Hamer, J. E., Roberti, K. A., Yelton, M. M., and

- Timberlake, W. E. 1985. Primary structure of the *trpc* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 199:37-45.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D. B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P. S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T. V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J. L., Garcia, M. J., Goble, A., Goldman, G. H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafton, A., Latge, J. P., Li, W. X., Lord, A., Majoros, W. H., May, G. S., Miller, B. L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M. A., Perte, M., Price, C., Pritchard, B. L., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M. A., Reichard, U., Renaud, H., Robson, G. D., de Cordoba, S. R., Rodriguez-Pena, J. M., Ronning, C. M., Rutter, S., Salzberg, S. L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J. C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., de Aldana, C. R. V., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J. H., Fraser, C., Galagan, J. E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., and Denning, D. W. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151-1156.
- Oka, K., Okubo, A., Kodama, M., and Otani, H. 2006. Detoxification of α -tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola* and its role in infection. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:152-158.
- Osborn, A., Bowyer, P., Lunness, P., Clarke, B., and Daniels, M. 1995. Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:971-978.
- Osborn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8:1821-1831.
- Osborn, A. E., Clarke, B. R., Lunness, P., Scott, P. R., and Daniels, M. J. 1994. An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45:457-467.
- Page, R. D. M. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357-358.
- Punt, P. J., Dingemans, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D. M., Pouwels, P. H., and Vandenhandel, C. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* 93:101-109.
- Quidde, T., Osborn, A. E., and Tudzynski, P. 1998. Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:151-165.
- Quidde, T., Buttner, P., and Tudzynski, P. 1999. Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:273-283.
- Roddick, J. G. 1977. Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 16:805-807.
- Roddick, J. G. 1979. Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. *Phytochemistry* 18:1467-1470.
- Roldan-Arjona, T., Perez-Espinosa, A., and Ruiz-Rubio, M. 1999. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:852-861.
- Sambrook, R. W., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sandrock, R. W., and VanEtten, H. D. 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin α -tomatine. *Phytopathology* 88:137-143.
- Sandrock, R. W., and Vanetten, H. D. 2001. The relevance of tomatinase activity in pathogens of tomato: Disruption of the β_2 -tomatinase gene in *Colletotrichum coccodes* and *Septoria lycopersici* and heterologous expression of the *Septoria lycopersici* β_2 -tomatinase in *Nectria haematococca*, a pathogen of tomato fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:159-171.
- Sandrock, R. W., DellaPenna, D., and VanEtten, H. D. 1995. Purification and characterization of β_2 -tomatinase, an enzyme involved in the degradation of α -tomatine and isolation of the gene encoding β_2 -tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:960-970.
- Schönbeck, F., and Schösser, E. 1976. Preformed substances as potential protectants. Pages 653-678 in: *Physiological Plant Pathology*. R. Heitefuss and P. H. Williams, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Steel, C. C., and Drysdale, R. B. 1988. Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by α -tomatine. *Phytochemistry* 27:1025-1030.
- Suleman, P., Tohamy, A. M., Saleh, A. A., Madkour, M. A., and Straney, D. C. 1996. Variation in sensitivity to tomatine and rishitin among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and strains not pathogenic on tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:131-144.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal-W—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Vanetten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., and Farmer, E. E. 1994. 2 Classes of plant antibiotics—phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Vanetten, H., Temporini, E., and Wasmann, C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: Why is it not required by all pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:83-93.
- Weltring, K. M., Wessels, J., and Pauli, G. F. 1998. Metabolism of the tomato saponin α -tomatine by *Gibberella pulicaris*. *Phytochemistry* 48:1321-1328.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

Broad Institute *F. oxysporum* genome database:
www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_group/