

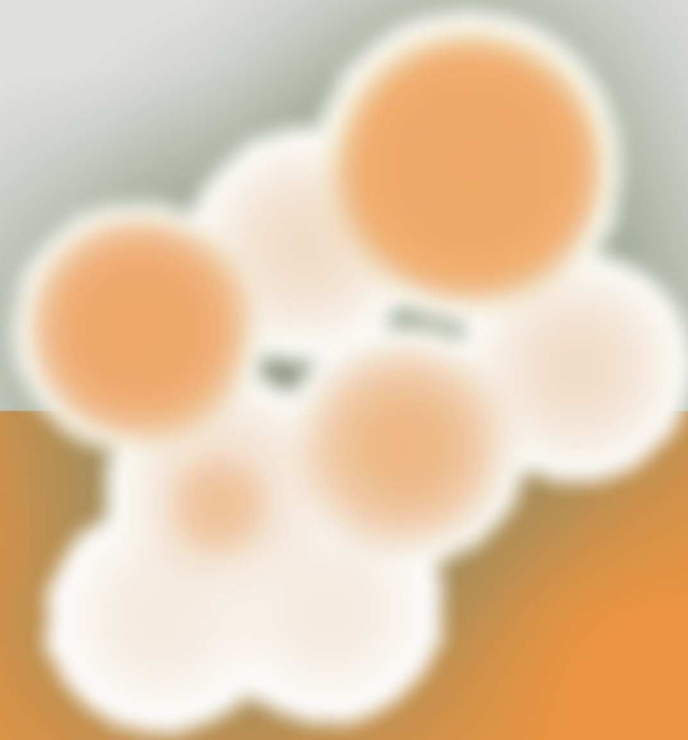


UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



# ESTUDIO DE LOS FACTORES DE PATOGENICIDAD/VIRULENCIA DE *PENICILLIUM DIGITATUM* SOBRE FRUTOS CÍTRICOS.

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Mario López Pérez  
Dirigida por: Luís González Candelas  
Valencia, 2013



**Universidad Politécnica de Valencia**  
Departamento de Biotecnología

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

**Estudio de los factores de  
patogenicidad/virulencia de *Penicillium  
digitatum* sobre frutos cítricos.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Mario López Pérez**

Dirigida por:

**Luís González Candelas**

Tutor:

**Ismael Rodrigo Bravo**

**Valencia, 2013**



*A mis padres.*



*“Domínate y conquítate a ti mismo! Triunfador no es el que vence a los demás, sino el que se conquista a sí mismo, frenando su vicios y superando sus límites. El triunfo sobre sí mismo es sin medida más difícil, y al que lo consigue se le puede colocar entre los héroes. Aprende a dominarte, y no te desanimes jamás. Si hoy no lo lograste, vuelve a empezar que, algún día triunfarás.” Anónimo*



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Luís González Candelas su excelente dirección y el darme la oportunidad de realizar esta Tesis.

También quiero agradecer a todos los miembros del Grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA con los que he compartido todos estos años ya que han sido un gran apoyo. A todas las personas que he conocido tanto en el IATA como en Valencia que han hecho que mi periodo allí fuese más llevadero y agradable, sintiéndome como en casa. En especial a mi compañera de piso.

A la Cooperativa vitivinícola de Llíria (Valencia) por habernos proporcionado los frutos para la realización de los bioensayos, sin los que hubiese sido imposible realizar esta Tesis. A la Dra. Sánchez-Torres, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, por habernos proveído del principal actor de esta Tesis, el aislado de *P. digitatum* Pd1. También a mi tutor de doctorado de la Universidad Politécnica de Valencia, el Dr. Ismael Rodrigo Bravo.

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del Departamento de Ciencia de los Alimentos del IATA (CSIC), gracias a una beca del Programa de Ayudas Predoctorales de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2006-12983 del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) asociada al proyecto AGL2005-04921-C02-01. Mi formación doctoral se ha completado con una estancia breve en la Universidad LaTrobe (Melbourne, Australia) bajo la supervisión de la Dra. Kim Plummer gracias a una ayuda del MEC para la movilidad de alumnos asociada a la beca FPI.

Finalmente, quisiera dar las gracias a mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento, por su ánimo en los momentos difíciles que son los que me han hecho continuar y no abandonar. Sin ellos esta Tesis no hubiese sido posible. No quiero olvidarme tampoco de mis hermanos que siempre han estado ahí para lo que he necesitado y sacarme una sonrisa en todo momento. Y por último, aunque lleva poco tiempo entre nosotros, al pequeño Nico que se ha convertido en la alegría de la familia.



## Resumen

Las pérdidas causadas por podredumbres durante la post-cosecha de frutos cítricos suelen suponer entre un 5 y un 10 % de la producción, siendo *Penicillium digitatum* el principal hongo patógeno, responsable de hasta el 80 % de las pérdidas causadas por podredumbres en frutos almacenados a temperatura ambiente. A pesar de la importancia económica de este patógeno nuestro conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad/ virulencia son muy escasos, en contraste con el avance experimentado en los últimos años en el conocimiento de las respuestas de defensa del fruto a la infección por este patógeno. Así, en el grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA se está trabajando en la caracterización a nivel bioquímico y molecular de las respuestas de los frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum* y en el proceso de inducción de resistencia en frutos cítricos frente a la infección.

Por este motivo en esta Tesis se han desarrollado un conjunto de herramientas esenciales para poder abordar la caracterización funcional de genes involucrados en virulencia/patogenicidad: transformación de *P. digitatum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilización de la proteína verde fluorescente como marcadora, metodología para la obtención de mutantes de delección de genes específicos, incluyendo mutantes nulos  $\Delta ku80$ , vectores para silenciamiento génico mediante RNAi y la construcción de una genoteca de DNA genómico de *P. digitatum*. Se ha secuenciado y analizado el factor de transcripción PacC, que controla la expresión de un grupo de genes regulados por el pH ambiental. En *P. digitatum* se produce una acidificación del medio para adaptarlo al pH óptimo de su arsenal de enzimas. Se han obtenido mutantes de expresión constitutiva de PacC que presentan una disminución la capacidad infectiva en un 20 %. Mediante el empleo de técnicas de alto rendimiento se ha construido una genoteca substractiva de cDNA para obtener fragmentos de genes de *P. digitatum* que se inducen durante la infección de frutos de naranja y se ha analizado la expresión génica de los mismos y se ha elaborado una macromatriz conteniendo más de 1330 clones de la genoteca. El grupo de genes con mayor representación en la genoteca y con altos valores de inducción, corresponde a genes que codifican cinco proteasas diferentes. Además, en la genoteca substractiva también hay una alta representación de genes que codifican enzimas de degradación de la pared celular, y otras proteínas implicadas en glucólisis, respuesta a estrés o detoxificación. La ya demostrada importancia de las enzimas de degradación de la pared celular en la virulencia de hongos fitopatógenos, su abundancia y niveles de inducción en la macromatriz nos llevaron a estudiar más en profundidad algunos de estos genes (dos poligalacturonasas y una pectin liasa). Para comprobar su implicación en el proceso de infección se secuenciaron y se obtuvieron mutantes de *P. digitatum* en los que se eliminó el gen. La disminución de la virulencia de estos mutantes sobre frutos de naranja con respecto a la cepa silvestre fue de aproximadamente un 25 %. Del conjunto de genes relacionados con el metabolismo redox se seleccionó por su patrón de expresión el gen *ris1*, que codifica una naftaleno dioxigenasa posiblemente implicada en la detoxificación de compuestos aromáticos. A diferencia de los mutantes nulos en los genes de las poligalacturonasas o de la pectin liasa, los mutantes nulos  $\Delta ris1$  no presentaron ninguna alteración en su capacidad patogénica.

## Resum

Les pèrdues causades per podridures durant la post-collita de fruits cítrics solen suposar entre un 5 i un 10 % de la producció, sent *Penicillium digitatum* el principal fong patògen, responsable de fins al 80 % de les pèrdues causades per podridures en fruits emmagatzemats a temperatura ambient. Tot i la importància econòmica d'aquest patògen, el nostre coneixement sobre els mecanismes de patogenicitat / virulència són molt escassos, en contrast amb l'avanç experimentat en els últims anys en el coneixement de les respostes de defensa del fruit a la infecció per aquest patògen. Així, en el grup de Fisiologia i Biotecnologia Postcollita de l'IATA s'està treballant en la caracterització a nivell bioquímic i molecular de les respostes dels fruits cítrics enfront de la infecció per *P. digitatum* i en el procés d'inducció de resistència en fruits cítrics enfront de la infecció.

Per aquest motiu en aquesta Tesi s'han desenvolupat un conjunt d'eines essencials per poder abordar la caracterització funcional de gens involucrats en virulència / patogenicitat: transformació de *P. digitatum* intervinguda per *Agrobacterium tumefaciens*, utilització de la proteïna verda fluorescent com a marcador, metodologia per a l'obtenció de mutants de delecció de gens específics, incloent mutants nuls  $\Delta ku80$ , vectors per silenciament gènic mitjançant RNAi i la construcció d'una genoteca de DNA genòmic de *P. digitatum*. S'ha seqüenciat i analitzat el factor de transcripció PacC, que controla l'expressió d'un grup de gens regulats pel pH ambiental. En *P. digitatum* es produeix una acidificació del medi per adaptar-lo al pH òptim del seu arsenal d'enzims. S'han obtingut mutants d'expressió constitutiva de PacC que presentaven una disminució de la capacitat infectiva en un 20 %. Mitjançant l'ús de tècniques d'alt rendiment s'ha construït una genoteca subtractiva de cDNA per obtenir fragments de gens de *P. digitatum* que s'indueixen durant la infecció de fruits de taronja i s'ha analitzat l'expressió gènica dels mateixos i s'ha elaborat una macromatriu contenint més de 1300 clons de la genoteca. El grup de gens en major representació en la genoteca i en alts valors d'inducció correspon a gens que codifiquen cinc diferents proteases. A més, en la genoteca subtractiva també hi ha una alta representació de gens que codifiquen enzims de degradació de la paret cel·lular, i altres proteïnes implicades en glucòlisi, resposta a estrès o detoxificació. La ja demostrada importància dels enzims de degradació de la paret cel·lular en la virulència de fongs fitopatògens, la seva abundància i nivells d'inducció a la macromatriu ens van portar a estudiar més en profunditat alguns d'aquests gens (dos poligalacturonases i una pectin liasa). Per tal de comprovar la seva implicació en el procés d'infecció es van seqüenciar i es van obtenir mutants de *P. digitatum* en què es va eliminar el gen. La disminució de la virulència d'aquests mutants sobre fruits de taronja pel que fa al silvestre va ser aproximadament d'un 25 %. Del conjunt de gens relacionats amb el metabolisme redox es va seleccionar pel seu patró d'expressió el gen *ris1*, que codifica una naftalè dioxigenasa possiblement implicada en la detoxificació de compostos aromàtics. A diferència dels mutants nuls en els gens de les poligalacturonases o de la pectin liasa, els mutants nuls  $\Delta ris1$  no van presentar cap alteració en la seva capacitat patogènica.

## Abstract

Postharvest fungal decay may cause significant losses to the citrus fruit, ranging from 5 to as high as 10 % of total production. *Penicillium digitatum* is the causal agent of green mold and constitutes the major pathogen, accounting for up to 80 % of losses due to fungal decay in fruits stored at room temperature. Despite its considerable economic interest, the pathogenicity / virulence mechanisms of *P. digitatum* remain largely unknown, in contrast to advances made in the knowledge of the fruit's defense responses to infection by this pathogen. Thus, the Postharvest Physiology and Biotechnology group is working on the biochemical and molecular characterization of the responses of citrus fruits against infection by *P. digitatum* and also processes that induced resistance against infection in citrus fruit.

In this thesis we have developed a set of essential tools to address the functional characterization of genes involved in virulence / pathogenicity: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *P. digitatum*, use of the green fluorescent protein as marker, methodology to obtain deletion mutants of specific genes, including  $\Delta ku80$  null mutants, RNAi vectors for gene silencing and constructing a genomic DNA library from *P. digitatum*. PacC transcription factor that controls the expression of a group of genes regulated by the environmental pH has been sequenced and analyzed. During infection growth, *P. digitatum* acidified the media to adjust the local pH to fit its enzymatic arsenal. Constitutive expression PacC mutants that exhibited a decrease in infectivity by 20 % were obtained. Using high throughput techniques a cDNA library to obtain subtractive gene fragments of *P. digitatum* which are induced during the infection of orange fruit, has been constructed and the gene expression analyzed. This data was used to develop a macroarray containing over 1330 clones from the library. The most abundant gene cluster represented in the library with high induction values, corresponding to genes encoding five different proteases. Furthermore, genes encoding cell wall degrading enzymes and other proteins involved in glycolysis and response to stress or detoxification are also highly represented in the subtractive library. It has already been demonstrated that the production of cell wall-degrading enzymes play an important role in virulence of phytopathogenic fungi, their abundance and macroarray induction levels led us to study more in depth three of these genes (two polygalacturonases and a pectin lyase). Null mutant of these genes were obtained in order to analyze their importance during the infection process. Decreased virulence of these mutants in orange fruit with respect to the wild strain was approximately 25 %. The *ris1* gene, encoding a naphthalene dioxygenase possibly involved in the detoxification of aromatic compounds, was selected for its gene expression pattern from the set of genes related to redox metabolism. Unlike null mutants of the polygalacturonase or pectin lyase genes,  $\Delta ris1$  null mutants showed no alteration in their pathogenicity.

<b><u>ÍNDICE GENERAL</u></b>	I
<b><u>LISTADO DE FIGURAS</u></b>	VII
<b><u>LISTADO DE TABLAS</u></b>	XII
<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	XIV
<b><u>I. INTRODUCCIÓN</u></b>	1
<b>1. POSTCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS</b>	2
1.1 Enfermedades Postcosecha	3
1.2 Principales enfermedades fúngicas postcosecha en frutos cítricos	3
1.3 Control de las podredumbres en postcosecha	5
1.3.1 Fungicidas químicos	6
1.3.2 Control alternativo	7
1.3.2.1 Control Físico	8
1.3.2.2 Control Químico	9
1.3.2.3 Control Biológico	10
1.3.2.4 Combinación de tratamientos para el tratamiento integral de enfermedades	11
<b>2. BIOLOGÍA DE <i>Penicillium digitatum</i></b>	13
<b>3. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO</b>	18
<b>4. FACTORES DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA EN HONGOS FITOPATÓGENOS</b>	22
4.1 Reconocimiento del huésped y cascadas de transducción de señales	22
4.2 Genes implicados en el metabolismo de nutrientes esenciales	28
4.3 Enzimas degradadoras de pared celular	29
4.4 Efectores	31
4.5 Producción y detoxificación de toxinas	34
4.6 Especies reactivas de oxígeno	35
4.7 Implicación del pH en patogénesis	38
<b>5. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS EN HONGOS FITOPATÓGENOS</b>	41
5.1 Aproximaciones a la transformación genética	41

5.2 Recombinación homóloga y no homóloga	42
5.3 RNA interferente	43
5.4 Proteína verde fluorescente	44
<b>6. DESARROLLO DE TÉCNICAS -ÓMICAS EN EL ESTUDIO DE HONGOS FILAMENTOSOS</b>	46
<b><u>II.OBJETIVOS</u></b>	54
<b><u>III. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	56
<b>1. ORGANISMOS</b>	57
1.1. Material vegetal	57
1.2 Microorganismos	57
1.2.1 Hongos	57
1.2.2 Bacterias	58
<b>2. INFECCIONES DE FRUTOS CÍTRICOS CON <i>P. digitatum</i></b>	58
2.1 Toma de muestras	59
2.1.1 Tejido fruto de naranja infectado con <i>P. digitatum</i>	59
2.1.2 Micelio de <i>P. digitatum</i>	60
2.2 Análisis estadístico	60
<b>3. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	60
3.1 RNA de fruto (infectado y no infectado) y de micelio	60
3.2 RNA de conidios	61
3.3 Purificación de mRNA	61
3.4 Extracción de DNA genómico de <i>P. digitatum</i>	61
3.5 DNA genómico de <i>P. digitatum</i> a pequeña escala	62
3. 6 Purificación de DNA plasmídico	62
3.6.1 Purificación de plásmidos a gran escala mediante lisis alcalina	62
3.6.2 Purificación de plásmidos a pequeña escala mediante lisis alcalina	63

3. 7 Purificación de DNA de fósmidos	63
3.7.1 Purificación de DNA de fósido a gran escala por lisis alcalina	63
3.7.2 Purificación de DNA de fósido a media escala por el método de ebullición	64
3.7.3. Purificación de DNA de fósido a media escala sin amplificación previa	64
<b>4. ANÁLISIS NORTHERN</b>	64
4.1. Preparación de las membranas	64
4.2 Marcaje de sondas	65
4.3 Hibridaciones y análisis de datos	65
<b>5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN</b>	66
5.1 Preparación y transformación de células quimio-competentes de <i>E. coli</i>	66
5.2 Preparación de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	66
5.3 Preparación de células electro-competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
<b>6. SECUENCIACIÓN</b>	68
6.1 Análisis de secuencias	68
<b>7. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES</b>	68
7.1 Diseño de oligonucleótidos	69
7.2 Preparación de vectores	71
7.2.1 Linearización de los vectores	71
7.2.2 Reacción de clonación USER	72
7.2.3 Transformación	72
<b>8. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PRF-HU2Fle</b>	73
<b>9. CONSTRUCCIONES DE RNA INTERFERENTE</b>	74
<b>10. TRANSFORMACIÓN DE <i>P. digitatum</i> MEDIANTE <i>A. tumefaciens</i></b>	75
10.1 Transformación de <i>P. digitatum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	75
10.2 Estabilidad mitótica de los transformantes	76

<b>11. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA SUSTRACTIVA DE cDNA ENRIQUECIDA EN GENES DE <i>P. digitatum</i> INDUCIDOS DURANTE LA INFECCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS</b>	76
11.1 Hibridación sustractiva mediada por PCR supresiva (SSH)	76
11.2 Elaboración e hibridación de una macromatriz de cDNA	77
11.3 Análisis de las hibridaciones de las macromatrices	78
<b>12. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE DNA GENÓMICO DE <i>P. digitatum</i></b>	79
<b>13. SECUENCIACIÓN DE GENES DE INTERÉS DESDE LA GENOTECA DE DNA</b>	80
13.1 Cribado de la genoteca	80
13.2 Obtención de secuencias de los genes	81
<b>14. PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE DNA</b>	84
14.1 Reacción de PCR en tiempo real	85
<b>15. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	86
<b><u>IV. RESULTADOS</u></b>	88
<b>1. HERRAMIENTAS GENÓMICAS</b>	89
1.1 Construcción de una genoteca de DNA genómico de <i>P. digitatum</i>	89
1.2 Transformación de <i>P. digitatum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> (ATMT)	90
1.2.1 Sensibilidad de <i>P. digitatum</i> a higromicina	90
1.2.2 Transformación de <i>P. digitatum</i>	90
1.2.3 Análisis molecular de los transformantes	91
1.2.4 Estabilidad mitótica de los transformantes	91
1.2.5 Optimización del sistema ATMT para <i>P. digitatum</i>	92
1.3 Proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein)	93
1.3.1 Vectores de expresión de la proteína verde fluorescente	93
1.3.2 Microscopía	94
1.3.3 Ensayos de infección transformantes de GFP	96

1.4 Obtención de mutantes de <i>P. digitatum</i> carentes del gen <i>ku80</i>	96
1.4.1 Obtención y caracterización de un mutante de <i>P. digitatum</i> carente del gen <i>ku80</i>	101
1.4.2 Comprobación número de copias mediante PCR en tiempo real	103
1.4.3 Análisis morfológico	105
1.4.4 Ensayos de infección	106
1.5 Uso de fleomicina como marcador de selección en <i>P. digitatum</i>	107
1.5.1 Sensibilidad de <i>P. digitatum</i> a fleomicina	107
1.5.2 Diseño del vector pRF-HU2Fle	108
1.5.3 Transformación de <i>P. digitatum</i> con el vector pRF-HU2Fle	109
1.6 Obtención de plásmidos binarios de RNA interferente para <i>P. digitatum</i>	110
<b>2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PacC</b>	<b>111</b>
2.1 Clonación y secuenciación del gen <i>pacC</i> de <i>P. digitatum</i>	112
2.2 Análisis de la secuencia del gen <i>pacC</i> de <i>P. digitatum</i>	115
2.3 Análisis de expresión de <i>pacC</i>	116
2.4 Obtención de mutantes <i>pacC</i> de <i>P. digitatum</i>	118
2.4.1 Construcción del plásmido de sobreexpresión pRF-HUE-pacC <sup>C</sup>	118
2.4.2 Construcción del plásmido de expresión constitutiva pRF-HU2-pacC <sup>C</sup>	119
2.4.3 Construcción del plásmido de delección pRF-HU2-ΔpacC1	120
2.4.4 Construcción del plásmido de delección pRF-HU2-ΔpacC2	121
2.5 Transformación de <i>P. digitatum</i> con los plásmidos pRF-HU2-pacC <sup>C</sup> , pRF-HU2-ΔpacC y pRF-HUE-pacC <sup>C</sup>	122
2.5.1 Ensayos de infección transformantes de PacC	123
<b>3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE <i>P. digitatum</i> QUE SE INDUCEN DURANTE EL PROCESO DE INFECCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS</b>	<b>124</b>
3.1 Secuenciación y análisis de las secuencias de clones de la genoteca PDS	127
3.2 Análisis de expresión de los clones presente en la genoteca PDS	129
3.3 Anotación funcional de las secuencias	134
3.4 Análisis de la expresión génica mediante hibridación Northern	136
<b>4. ANÁLISIS DE GENES PRESUNTAMENTE IMPLICADOS EN</b>	



<b>PATOGENICIDAD/VIRULENCIA</b>	140
4.1 Poligalacturonasa 1 ( <i>pg1</i> )	140
4.2 Poligalacturonasa 2 ( <i>pg2</i> )	143
4.3 Pectin liasa ( <i>pn1</i> )	147
4.4 Proteína Rieske ( <i>ris1</i> )	150
4.5 Obtención de mutantes nulos de <i>P. digitatum</i> en los genes <i>pg1</i> , <i>pg2</i> , <i>pn1</i> y <i>ris1</i>	154
4.5.1 Comprobación del número de copias de los transformantes mediante PCR tiempo real	156
4.6 Análisis morfológico de los mutantes nulos $\Delta pg1$ , $\Delta pg2$ , $\Delta pn1$ y $\Delta ris1$ de <i>P. digitatum</i>	158
4.7 Ensayos de infección de los mutantes nulos $\Delta pg1$ , $\Delta pg2$ , $\Delta pn1$ y $\Delta ris1$ de <i>P. digitatum</i>	159
<b><u>V.DISCUSIÓN</u></b>	165
<b>1. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS PARA <i>P. digitatum</i></b>	166
1.1 Uso de la proteína verde fluorescente para el estudio de <i>P. digitatum</i>	168
<b>2. IMPLICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PacC DE <i>P. digitatum</i> EN PATOGENICIDAD</b>	170
<b>3. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES CON EXPRESIÓN REDUCIDA DE GENES DIANA</b>	173
3.1 Obtención de mutantes nulos <i>ku80</i> ( $\Delta ku80$ )	173
3.2 RNA interference (RNAi)	175
<b>4. APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN <i>P. digitatum</i>- FRUTO CÍTRICO</b>	175
4.1 Identificación de genes de <i>P. digitatum</i> que se inducen durante la infección de frutos cítricos	175
4.2 Respuesta a estrés y detoxificación	178
4.3 Enzimas relacionadas con la pared celular	182
4.4 Resistencia a fungicidas	189

4.5 Glucólisis	192
4.6 Transducción de señales	192
4.7 Otras proteínas	193
<b>5. PROTEASAS</b>	194
<b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b>	199
<b><u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	201

**LISTADO DE FIGURAS.**

**Figura 1.** Modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas (Jones y Dangl, 2006).

**Figura 2.** Ciclo de la proteína G.

**Figura 3.** Ruta de las MAPK en hongos patógenos (Zhao *et al.* 2007).

**Figura 4.** Evolución de la infección en frutos cítricos inoculados con *P. digitatum*.

**Figura 5.** Imágenes representativas de la metodología seguida en los ensayos de infección de frutos cítricos con *P. digitatum*.

**Figura 6.** Representación esquemática de los vectores pRF-HU2 y pRF-HUE.

**Figura 7.** Representación esquemática de los vectores utilizados para las construcciones de RNA interferente.

**Figura 8.** Representación esquemática del vector pEGFP.

**Figura 9.** Representación esquemática del vector pCAMgfp (Sesma y Osbourn, 2004).

**Figura 10.** Distribución de tamaños de 3 muestras de DNA genómico de *P. digitatum* mediante electroforesis en campo pulsante.

**Figura 11.** Digestión con la enzima de restricción BamHI de los fósmidos obtenidos de 4 clones seleccionados al azar de la genoteca.

**Figura 12.** PCR dúplex de 6 transformantes aleatorios.

**Figura 13.** Estabilidad mitótica de los transformantes de *P. digitatum*.

**Figura 14.** Representación esquemática de los vectores utilizados para la proteína verde fluorescente.

**Figura 15.** Visualización microscópica de diferentes estadios de transformantes de *P. digitatum* con las dos variantes de la proteína verde fluorescente utilizadas, con su correspondencia de la misma área visualizada en campo claro.

**Figura 16.** Incidencia (%) de la infección en frutos "Navel Late" inoculados con transformantes de *P. digitatum* que expresan las variantes eGFP y sGFP de la proteína verde fluorescente.

**Figura 17.** Secuencia completa del gen *ku80* de *P. digitatum*.

**Figura 18.** Alineamiento de la secuencia de la proteína *ku80* de *P. digitatum* con la proteína Pc18g018200 de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin

**Figura 19.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína *Ku80* de *P. digitatum*.

**Figura 20.** Representación esquemática del vector pRF-HU2-KU.

**Figura 21.** Análisis de transformantes de *P. digitatum* obtenidos con el plásmido pRFHU2-*ku80*.

**Figura 22.** Crecimiento en medio PDA de tres transformantes del gen *ku80* de *P. digitatum*.

**Figura 23.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes de *P. digitatum*.

**Figura 24.** Representación esquemática del diseño del vector pRF-HU2Fle.

**Figura 25.** Representación esquemática de los plásmidos pKMP1 y pKMP2.

**Figura 26.** Evolución del pH en heridas de frutos de naranja inoculados con *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*.

**Figura 27.** Escrutinio de la genoteca de DNA genómico para clonar el gen *pacC* de *P. digitatum*.

**Figura 28.** Secuencia completa del gen *pacC* de *P. digitatum*.

**Figura 29.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del factor de transcripción *PacC* de *P. digitatum* con las descritas en otros hongos filamentosos

**Figura 30.** Análisis Northern del patrón de expresión del gen *pacC*.

**Figura 31.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HUE-*pacC*<sup>C</sup>.

**Figura 32.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2-*pacC*<sup>C</sup>.

**Figura 33.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2- $\Delta$ *pacC*1.

**Figura 34.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2- $\Delta$ *pacC*2.

**Figura 35.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes de *P. digitatum* que expresan constitutivamente el factor de transcripción *PacC*.

**Figura 36.** Comparación de diferentes proporciones de RNA de hongo (H) y naranja (N) con RNA de tejido de naranja infectado a los 3 días tras la inoculación (I3).

**Figura 37.** Hibridaciones Northern de los genes seleccionados para comprobar la eficiencia del proceso de sustracción.

**Figura 38.** Comprobación de la eficiencia de la sustracción.

**Figura 39.** Imágenes de la hibridación de las macromatrices generadas a partir de la genoteca PDS.

**Figura 40.** Análisis de Ontologías Génicas (GO) en la categoría de “proceso biológico”, nivel 5, de los 170 unigenes obtenidos de la genoteca PDS.

**Figura 41.** Análisis de Ontologías Génicas (GO) en la categoría de “función molecular”, nivel 5, para los 170 unigenes obtenidos de la genoteca PDS.

**Figura 42.** Hibridaciones Northern de los clones seleccionados de la genoteca PDS enriquecida en genes de *P. digitatum* que se inducen durante el proceso de infección de frutos de naranja.

**Figura 43.** Secuencia completa del gen *pg1* de *P. digitatum*.

**Figura 44.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PG1 utilizando el programa de predicción I-TASSER.

**Figura 45.** Localización *in silico* de dominios en la proteína PG1 de *P. digitatum*.

**Figura 46.** Secuencia completa del gen *pg2* de *P. digitatum*.

**Figura 47.** Alineamiento de la secuencia de la proteína PG2 de *P. digitatum* con la poligalacturonasa AF195791\_1 de *Penicillium griseoroseum* obtenido con ClustalX.

**Figura 48.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PG2 utilizando el programa de predicción I-TASSER.

**Figura 49.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína PG2 de *P. digitatum*.

**Figura 50.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las dos poligalacturonasas PG1 y PG2 de *P. digitatum*.

**Figura 51.** Secuencia completa del gen *pn11* de *P. digitatum*.

**Figura 52.** Alineamiento de la secuencia PNL1 de *P. digitatum* con la pectin liasa D de *Aspergillus niger* obtenido con ClustalX.

**Figura 53.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PNL1 utilizando el programa de predicción I-TASSER.

**Figura 54.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína PNL1 de *P. digitatum*.

**Figura 55.** Secuencia completa del gen *ris1* de *P. digitatum*.

**Figura 56.** Alineamiento de la secuencia RIS1 de *P. digitatum* con la proteína hipotética de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 obtenido con ClustalX.

**Figura 57.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína RIS1 utilizando el programa de predicción I-TASSER.

**Figura 58.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína RIS1 de *P. digitatum*.

**Figura 59.** Representación esquemática de los vectores pRF-HU2-RP, pRF-HU2-PL, pRF-HU2-PG1 y pRF-HU2-PG2.

**Figura 60.** Comprobación de los transformantes de *P. digitatum* mediante PCR para cada uno de los genes *pg1*, *pg2*, *pnl1* y *ris1*

**Figura 61.** Crecimiento en medio sólido PDA de los transformantes obtenidos de todos los genes ensayados.

**Figura 62.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para el gen *pg1*.

**Figura 63.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para para el gen *pg2*.

**Figura 64.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para para el gen *pnl1*.

**Figura 65.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para para el gen *ris1*.

**LISTADO DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Efecto del ataque de los hongos en la modulación del pH del huésped por diferentes patógenos (Prusky y Yacoby, 2003).

**Tabla 2.** Bases de datos que describen genes relacionados con la patogenicidad en hongos.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones promotoras y terminadoras de cada uno de los genes empleados para la obtención de las construcciones de delección.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para verificar las construcciones.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la construcción del plásmido pKMP1.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados para el cribado de los genes.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los genes.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de PCR en tiempo real para cada uno de los genes ensayados.

**Tabla 9.** Determinación del número de copias del gen *ku80* en transformantes de *P. digitatum* mediante PCR en tiempo real.

**Tabla 10.** Ensayos de la susceptibilidad del aislado Pd1 de *P. digitatum* al antibiótico fleomicina en medio YPD.

**Tabla 11.** Susceptibilidad del aislado Pd1 de *P. digitatum* al antibiótico fleomicina en medio PDA.

**Tabla 12.** Resumen de las características generales de la genoteca PDS.

**Tabla 13.** Anotación de los unigenes de la genoteca sustraída de cDNA PDS que tienen más de 3 ESTs.

**Tabla 14.** Genes presentes en la genoteca PDS con un nivel de inducción  $\geq 2$  en tejido de naranja a los 3 días de la inoculación con *P. digitatum* con respecto a micelio del hongo después de 3 días de crecimiento en medio de cultivo líquido.

**Tabla 15.** Oligonucleótidos utilizados para diferenciar entre transformantes de delección y ectópicos de los distintos genes.

**Tabla 16.** Análisis de los transformantes.

**Tabla 17.** Determinación del número de copias de T-DNA que se han integrado en cada transformante mediante PCR en tiempo real.

**Tabla 18.** Ejemplos de la frecuencia de recombinación homóloga en cepas silvestres y líneas  $\Delta ku70$  de varios hongos filamentosos.



## ABREVIATURAS

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
A <sub>600</sub>	Absorbancia a 600 nm
ABC	Transportador asociado a la unión de ATP ('ATP binding cassette')
AEBSF	Fluoruro de 4 - (2-aminoetil) bencenosulfonilo
AO	Ácido oxálico
ATMT	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Avr	Gen dominante de avirulencia
BABA	Ácido DL-3-aminobutírico
BrEt	Bromuro de etidio
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementario
CHS	Chalcona sintasa
CMC	Carboximetilcelulosa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMIs	Inhibidores de la demetilación
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
dpi	Días después de la inoculación
DSB	Rotura de doble hebra ('Double-Strand Break')
DTC	Dietilditiocarbamato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ESI	Ionización por electroespray
ETI	Inmunidad activada por efector ('Effector-Triggered Immunity')
ETS	Susceptibilidad activada por efector ('Effector-Triggered Susceptibility')
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
FDR	Corrección de falsos positivos
FGI	Fungal Genome Initiative
Fle	Fleomicina
FT-ICR	Resonancia de la transformada de Fourier ión ciclotrón
GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GFP	Proteína verde fluorescente ('Green Fluorescent Protein')
GO	Ontología génica
GPY	Medio de cultivo compuesto por glucosa, peptona y extracto de levadura
GST	Glutation S-transferasa
Hph	Gen de resistencia a higromicina
hpi	Horas posteriores a la inoculación
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución ('High Performance Liquid Chromatography')
HR	Humedad relativa
HST	Toxina selectiva de huésped
IMZ	Imazalil

LB	Luria-Bertani
LMR	Límite máximo de residuos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MDH	Malato deshidrogenasa
MFS	Superfamilia falicitadora de importe ('Major Facilitator Superfamily')
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MOPS	Ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
NADPH	Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	Recombinación no homóloga ('Non-Homologous End Joining')
PAL	Fenilalanina ammonio liasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógeno ('Pathogen-Associated Molecular Patterns')
PBS	Tampón fosfato sódico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Medio de cultivo compuesto por patata, dextrosa y agar
PDB	Medio de cultivo líquido compuesto por patata y dextrosa
PEG	Polietilenglicol
PG	Poligalacturonasa
PGIPs	Proteínas inhibitoras de poligalacturonasas ('Polygalacturonase-Inhibiting Proteins')
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PL	Pectin liasa
POX	Peroxidasa
PR	Relacionadas con la patogénesis ('pathogenesis-related')
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones ('Pattern Recognition Receptors')
<i>P<sub>trpC</sub></i>	Promotor del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i>
PTT1	Fosfopantitenil tranferasa
<i>R</i>	Gen de resistencia
RH	Recombinación homóloga
RMN	Resonancia magnética nuclear ('Nuclear Magnetic Resonance')
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNA-Seq	Secuenciación masiva de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAGE	Análisis en serie de la expresión génica ('Serial Analysis of Gene Expression')
SCSIE	Servicio de secuenciación de ADN de la Universidad de Valencia
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SOPP	Ortofenilfenato sódico
SSC	Citrato sódico + cloruro sódico
SSH	Hibridación substractiva medida por PCR supresiva
TBZ	Tiabendazol
TCW	Pared celular de tomate

---

**Abreviaturas**

---

TtrpC      Terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*  
UV        Ultravioleta

**INTRODUCCIÓN**

---

Actualmente, el control de hongos patógenos durante la postcosecha de frutos se realiza mediante la aplicación de fungicidas químicos. Sin embargo, la amplia utilización de agroquímicos en los tratamientos postcosecha ha sido puesta en cuestión por los problemas que originan en la salud humana y en el medioambiente. Por estas razones, los consumidores demandan cada vez más productos libres de residuos químicos. Un problema adicional, y no menos importante, es la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los fungicidas utilizados. Por estas razones resulta imprescindible diseñar y desarrollar nuevas estrategias de control válidas que cumplan los requisitos toxicológicos y ambientales cada vez más estrictos. Durante los últimos años se están investigando diversos tratamientos alternativos al empleo de fungicidas, ya sean físicos, químicos o biológicos, para poder controlar las enfermedades postcosecha de frutas y verduras. Desde el punto de vista de la investigación básica, resulta imprescindible profundizar en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad del hongo y de los mecanismos de defensa de la planta. En este sentido la biología molecular, aplicada al análisis de las interacciones planta-patógeno está poniendo al alcance del investigador poderosas herramientas de trabajo que posibilitan estrategias experimentales muy útiles para profundizar en el análisis de los mecanismos que participan en estos procesos, donde se pretende la identificación de aquellos genes fúngicos que resulten esenciales en patogénesis, siendo por tanto las proteínas codificadas por estos genes potenciales dianas para la próxima generación de agentes antifúngicos.

### **1. Postcosecha de frutos cítricos**

El género *Citrus* agrupa especies de grandes arbustos o arbolillos perennes (entre 5 y 15 m) cuyos frutos poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, que les proporciona ese típico sabor ácido tan característico. Oriundo del Asia tropical y subtropical, este género pertenece a la familia de las *Rutáceas* y contiene tres especies y numerosos híbridos cultivados, entre los que se incluyen los frutos más ampliamente comercializados, como el limón, la naranja, la lima, el pomelo y la mandarina, con diversas variedades que dependen de la región en la que se cultive cada una de ellas. Los cítricos constituyen el primer cultivo frutal del mundo, con una producción de 129 millones de toneladas en la campaña de 2011. España es el sexto productor mundial de frutos cítricos (después de China, Brasil, EEUU, India y México) con una producción de 5,2 millones de toneladas en 2011 y el mayor exportador de fruta fresca a nivel mundial (FAO, 2011, <http://www.fao.org>). En España también representa el principal cultivo frutal, siendo la Comunidad Valenciana la responsable del 68 % de la producción nacional; de ahí la importancia de este cultivo.

La fruta, al ser un producto perecedero, precisa de una tecnología postcosecha para su conservación que facilite la preservación de sus características organolépticas, así como su apariencia en términos de frescura, color y tersura. Durante el largo período de conservación de algunas variedades de fruta, ésta sufre una serie de pérdidas debidas a la disminución de peso y/o a la aparición de alteraciones tanto patológicas como fisiológicas.

### **1.1 Enfermedades Postcosecha**

Las enfermedades postcosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la citricultura mundial. Debido al bajo pH de los tejidos cítricos, y de la mayoría de los frutos en general, los agentes patógenos responsables de la gran mayoría de las enfermedades de postcosecha son hongos. Las pérdidas debidas a las podredumbres fúngicas son muy variables y dependen del área productora, la especie y el cultivar, la edad y condiciones de los árboles, las condiciones climatológicas durante toda la campaña, la época y la forma de recolectar, el manejo de los frutos en la postcosecha y las condiciones de almacenamiento (Eckert y Brown, 1986). Las enfermedades de los cítricos ocasionadas por hongos provocan pérdidas económicas en todo el mundo y en algunos casos alcanzan hasta el 50 % de la producción total de los frutos. La aplicación de fungicidas reduce las pérdidas significativamente, pero éstas aún constituyen entre un 5-10 % de la producción total (Ismail, 2004).

En España, aunque las pérdidas producidas por estos microorganismos son muy variables, se estima que las pérdidas habituales por podredumbres en una campaña normal media suponen entre el 3 y el 6 % del total de la producción, pudiendo llegar hasta el 12 % en años de condiciones climáticas favorables para el desarrollo de las podredumbres, es decir, temperaturas superiores a 24 °C y humedad relativamente elevada. Cálculos realizados en 1987, cuando la producción de cítricos en España fue de 4 millones de toneladas, estimaron unas pérdidas por podredumbres de más de 36 millones de euros (Tuset, 1987; Tuset 1999). Esto nos da una idea de la importancia de las enfermedades postcosecha y más si tenemos en cuenta que en 2011 la producción española superaba los 5,1 millones de toneladas (FAO, 2013). La infección por hongos puede ocurrir durante el cultivo, en el momento de la recolección, durante el procesamiento, almacenamiento, transporte e incluso en el comercio final o en el domicilio del consumidor. Los síntomas de deterioro se manifiestan cuando el hongo fitopatógeno comienza a desarrollarse activamente en el fruto. En muchos casos de infección se aprecia un cambio de coloración y la destrucción del tejido con la aparición de lesiones.

### **1.2 Principales enfermedades fúngicas postcosecha en frutos cítricos**

Las especies de hongos que causan podridos tienen un gran poder de adaptación a las condiciones adversas, incluso a las bajas temperaturas. Aunque existen alrededor de 30 o 40 especies identificadas como hongos fitopatógenos de frutos cítricos, en la práctica sólo algunos géneros presentan importancia económica. *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.* y *Rhizopus spp.* se caracterizan por colonizar numerosos sustratos y poseer una extraordinaria capacidad de fructificación y multiplicación, produciendo pequeñas esporas de fácil diseminación, lo que conlleva que los frutos sean fácilmente contaminados a partir de esporas producidas en partes enfermas de la planta, centrales de embalaje, cámaras frigoríficas, etc. Durante la postcosecha de frutos cítricos se han detectado cerca de una

veintena de especies de hongos causantes de enfermedades. Los patógenos responsables de las enfermedades de mayor importancia son:

***Penicillium digitatum* Sacc.** Es el principal hongo patógeno de frutos cítricos, produce la llamada podredumbre verde, siendo responsable de hasta el 80 % de las pérdidas causadas por podredumbres postcosecha. Es un hongo ascomiceto, con hifas cilíndricas y los conidióforos forman ramas irregulares tabicadas. La forma de reproducción es mediante esporas asexuales o conidios que se generan por escisión en cadenas de longitud variable y pueden presentar diferente longitud y tamaño, incluso dentro de la misma cadena. Estas esporas son mayoritariamente elipsoidales con unas dimensiones de 3,5-8,0 x 3,0-4,0  $\mu\text{m}$  (Samson *et al.* 1995). En medio artificial las colonias son de aspecto similar a las que se desarrollan en frutos infectados. Su crecimiento es óptimo a 24 °C, muy lento a temperaturas superiores a los 30 °C o inferiores a los 10 °C y a 1 °C su crecimiento queda inhibido completamente (Whiteside *et al.* 1993). La enfermedad se manifiesta inicialmente con una mancha circular alrededor del punto de infección. A temperaturas favorables para el crecimiento del hongo, entre 20-28 °C, esta mancha acuosa y descolorida de la superficie se hace más grande y en el centro de la infección comienza aparecer un micelio de color blanco. Cuando el área del micelio crece comienzan a producirse esporas de color verde-oliva. La progresión de la enfermedad lleva a la descomposición interna del fruto el cual queda completamente cubierto de esporas en un plazo de entre 5 y 10 días.

*P. digitatum* es un patógeno de herida estricto, por lo que las esporas situadas en la superficie necesitan de pequeñas lesiones en la piel para penetrar en el tejido vegetal (Kavanagh y Wood, 1967). Si la herida penetra unos 2 ó 3 mm dentro del albedo o afecta a una glándula de aceite la infección se vuelve irreversible al cabo de 2 días (Eckert y Eaks, 1989). La contaminación por este hongo tiene lugar durante la recolección, confección, transporte y manipulación, aunque el inóculo mayoritario procede del campo, principalmente a partir de conidios de otros frutos enfermos que se diseminan con facilidad. (Tuset, 1987). Las heridas que constituyen la entrada del patógeno son en su mayoría heridas mecánicas que se producen en la recolección y el manejo postcosecha de los frutos, pero también pueden producirse en el campo o por causas fisiológicas, como el frío. La alta humedad relativa necesaria para la prevención de la deshidratación y pérdida de peso de los frutos durante el almacenamiento favorece el desarrollo de este patógeno. Es sabido que la acumulación de agua en la superficie de los cítricos estimula el desarrollo de la podredumbre verde, por lo que un ligero secado del fruto podría reducir su susceptibilidad al podrido (Eckert, 1978).

***Penicillium italicum* Wehmer.** Es el segundo hongo fitopatógeno más importante en la postcosecha de frutos cítricos, causante de la podredumbre azul (Tuset, 1987). La temperatura óptima de crecimiento de *P. italicum* es la misma que la de *P. digitatum*, entre 20 y 28 °C. Sin embargo, *P. italicum* es una especie más adaptada a temperaturas inferiores a 10 °C, por lo que es especialmente importante durante la frigoconservación. Los primeros síntomas de la enfermedad son iguales a los de la podredumbre verde. Sobre el centro de la

lesión aparece micelio blanco, que se desarrolla más lentamente que el de *P. digitatum*, pero que sin embargo esporula más rápidamente y sus esporas poseen un color azul.

Otros hongos causantes de infección en frutos cítricos durante la postcosecha son *Geotrichum candidum*, causante de la podredumbre ácida, especialmente importante después de estaciones húmedas prolongadas. La podredumbre causada por *Alternaria citri* aparece principalmente como una podredumbre del pedúnculo en frutos almacenados durante mucho tiempo, aunque a veces la podredumbre se desarrolla en el extremo foliar del fruto en la plantación, produciendo caída anticipada de frutos. *Colletotrichum gloesporioides*, causante de la antracosis, sólo aparece en frutos dañados por otros agentes, como quemaduras del sol, frutos sobremaduros o enfermedades. *Phytophthora citrophthora*, agente causal de la podredumbre parda, está presente en las zonas productoras de cítricos en las que llueve durante las últimas fases de desarrollo del fruto. La podredumbre causada por *Aspergillus* únicamente causa problemas cuando el fruto se mantiene mucho tiempo almacenado a altas temperaturas (Agrios, 2007).

### **1.3 Control de las podredumbres en postcosecha**

En los últimos años los sistemas mayoritariamente utilizados para el control de podredumbres en postcosecha se han basado en la utilización sistemática de productos químicos aplicados justo después de la recolección y previo a su conservación frigorífica. En la actualidad hay un número reducido de fungicidas autorizados para su utilización en la postcosecha de frutos cítricos. Los tratamientos más ampliamente utilizados se aplican mediante ducha ("drencher") o en balsa y se basan generalmente en una combinación de dos o más fungicidas. Las materias activas más utilizadas son los imidazoles (imazalil (IMZ) y procloraz), los benzimidazoles (tiabendazol (TBZ) y benomilo) y ortofenilfenato sódico (SOPP) (Eckert y Brown, 1986).

Desde el año 2000 y mediante una resolución de la dirección general de Innovación Agraria y Ganadería (CAPA, 2001) en la que se establecen las normas para la producción integrada en cítricos, se estableció que el tiabendazol, el imazalil y el ortofenilfenato sódico son las tres únicas materias activas permitidas, especificando que se evitaría en lo posible su utilización. Esta resolución se modificó en el 2004 (CAPA, 2004), añadiendo el miclobutanil, el metil tiofanato y el procloraz a la lista de productos tolerados para los tratamientos postcosecha en frutos cítricos así como la homologación y registro de dichas sustancias por el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios. Debido al grave problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes Estados, en especial los más desarrollados, han establecido una serie de límites máximos de residuos de fungicidas postcosecha en frutos cítricos (LMR) que para todos los países pertenecientes a la EU son los siguientes: tiabendazol (5 ppm), imazalil (5 ppm), SOPP (12 ppm), miclobutanil (3 ppm) y procloraz (10 ppm).



### **1.3.1. Fungicidas químicos**

Durante muchos años, el SOPP, TBZ y IMZ han sido registrados para su uso contra las podredumbres de cítricos. Cada uno tiene un modo de acción diferente. Utilizados solos, combinados en mezclas o aplicados secuencialmente por separado han sido el primer método utilizado para el control de las podredumbres de frutos cítricos durante el almacenamiento durante más de 25 años (Ismail, 2004).

El tratamiento usando estos fungicidas, sin embargo, está comprometido debido a la aparición de poblaciones de patógenos resistentes. Además se han identificado aislados que son resistentes a uno, dos o los tres fungicidas (Bus *et al.* 1991; Eckert, 1982; Harding 1962; Holmes y Eckert, 1999). La reducción de la eficacia de estos fungicidas junto con la revisión periódica, la retirada o cancelación de muchos de ellos ha estimulado la investigación de nuevos materiales que podrían ser eficientemente incorporados a los programas de control de las podredumbres de cítricos (Adaskaveg *et al.* 2002). En cuanto a la toxicidad aguda, el IMZ es el que presenta mayores problemas. El IMZ es un fungicida de categoría II (Tóxico al ser humano), mientras que el SOPP y el TBZ pertenecen a las categorías III (Moderadamente tóxico al ser humano) y IV (Poco tóxico al ser humano) respectivamente.

Dentro de los fungicidas sistémicos se engloban los benzimidazoles y los denominados inhibidores de la demetilación de esteroides o DMIs. Los derivados del benzimidazol, como tiabendazol (TBZ), benomilo y carbendazima, se empezaron a utilizar como fungicidas a finales de los años sesenta. Estos compuestos son activos frente a un amplio espectro de hongos patógenos, entre ellos *P. digitatum* y *P. italicum*. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la tubulina del citoesqueleto, previniendo su polimerización y la elongación de los microtubulos, e interfiriendo en los procesos de división y movimiento celular (Davidse, 1986). Otros fungicidas introducidos a finales de los setenta son los derivados del imidazol, como el imazalil (IMZ) y el procloraz, los cuales inhiben la demetilación del carbono 14 del lanosterol o 24-metileno dihidrolanosterol, que es un sustrato de la citocromo P450 esterol demetilasa en la biosíntesis de los esteroides fúngicos, como el ergosterol (Hamamoto *et al.* 2000), componente esencial de la membrana celular de los hongos que afecta a la permeabilidad celular.

La azoxistrobina, el fludioxonil y el pirimetanil han sido clasificados como fungicidas de riesgo reducido por la Agencia de Protección de Medio Ambiente de los Estados Unidos para el tratamiento de los cítricos y aceptados para su uso como sustancias activas en la formulación de plaguicidas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Estos fungicidas representan las primeras introducciones de fungicidas para el uso en postcosecha de cítricos desde el registro del Imazalil en 1981 (Adaskaveg *et al.* 2004). Kanetis y colaboradores (2007) han demostrado la eficacia de estos fungicidas para el control postcosecha de las podredumbres de frutos cítricos (principalmente *P. digitatum* y *P. italicum*). La introducción de estos tres nuevos fungicidas puede hacer efectiva la mezcla de estos fungicidas con los ya previamente establecidos para el diseño de programas de rotación que podrían retrasar la aparición de resistencias frente a estos nuevos compuestos.

La resistencia a los fungicidas puede originarse por varios mecanismos: alteración del sitio diana, reduciendo la unión del fungicida; síntesis de una enzima alternativa capaz de sustituir a la enzima diana; sobreproducción de la diana del fungicida; descomposición metabólica del fungicida o un flujo activo o reducción de la cantidad admitida de fungicida (Fernández-Ortuño *et al.* 2008).

En los hongos, los sistemas de transporte han evolucionado para conferir resistencia natural contra las sustancias tóxicas, por lo tanto, no es sorprendente que estos transportadores también confieran resistencia a los fungicidas (de Waard *et al.* 2006; Del Sorbo *et al.* 2000). Dos familias de sistemas transportadores de membrana se han relacionado con la secreción de compuestos tóxicos: los transportadores ABC (de "ATP binding cassette") y los MFS ("Major Facilitator Superfamily"). Los transportadores ABC utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para el transporte de diversas sustancias en contra del gradiente de concentración a través de la membrana plasmática. Los transportadores MFS, sin embargo, son incapaces de hidrolizar el ATP y usan la fuerza motriz de los protones para facilitar el transporte no sólo de tóxicos sino también de azúcares, péptidos e iones (Pao, 1998). Estos transportadores han sido descritos en varios hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *P. digitatum*, etc. (Andrade *et al.* 2000a, 2000b; del Sorbo *et al.* 2000; Nakaune, 2002; Schoonbeek, *et al.* 2003; Stergiopoulos *et al.* 2002). Por ejemplo, un mutante de *B. cinerea* en el que se reemplazó el gen *Bcmfs1*, que codifica un transportador MFS, mostró un incremento de la sensibilidad a compuestos tóxicos naturales como la camtotecina y la cercosporina, que son producidos por la planta *Camptotheca acuminata* y por el hongo patógeno de plantas *Cercospora kikuchii*, respectivamente. Los transformantes que sobreexpresaron este gen manifestaron una disminución de la sensibilidad a estos compuestos y a diferentes fungicidas, incluyendo azoles. Estos resultados demuestran que el transportador MFS *Bcmfs1*, está involucrado en la protección contra toxinas naturales y fungicidas (Hayashi *et al.* 2002).

### **1.3.2 Control alternativo**

Debido a toda la problemática expuesta en el punto anterior, todos los recursos y esfuerzos que se están llevando a cabo llevan la misma dirección: conseguir un control integrado alternativo que permita minimizar las aplicaciones de pesticidas y obtener así una fruta libre de residuos y más cuando nos referimos al tratamiento postcosecha, ya que es el proceso que se encuentra más cerca del consumidor. El objetivo ideal de cualquier programa de producción integrada sería la eliminación total de fungicidas sintéticos en postcosecha. Según la naturaleza, los sistemas alternativos podríamos clasificarlos en físicos, químicos y biológicos.

### **1.3.2.1 Control Físico**

Los métodos físicos tienen el beneficio de que no producen residuos perjudiciales para el medio ambiente, sin embargo, las desventajas incluyen eficacia limitada y variable y una falta de actividad preventiva y persistencia.

Los tratamientos de calor constituyen una alternativa prometedora al uso de productos químicos de síntesis y se suelen emplear para mantener los frutos a temperaturas superiores a los 30 °C (con humedades relativas superiores al 90 %) durante 1-3 días, es decir, los tratamientos de curado, que han demostrado una elevada eficacia en el control de las principales podredumbres en cítricos (Ben-Yehoshua *et al.* 1987; Plaza *et al.* 2003). A pesar de su buena eficacia, los tratamientos de curado no están muy implementados comercialmente debido al coste de la calefacción, a la inmovilización de grandes cantidades de fruta durante períodos relativamente largos y porque un excesivo o incontrolado tratamiento puede dañar la calidad del fruto (Plaza *et al.* 2003). Otra alternativa son los tratamientos con agua caliente, que es una tecnología fácil, más barata y factible que el curado. Inmersiones breves (2-5 min) en agua a 45-55 °C han mostrado una reducción de las podredumbres verde y azul en cítricos (Schirra y D'hallewin, 1997; Hong *et al.* 2007). Los inconvenientes que presenta este método son que el agua caliente no es un tratamiento fungicida muy persistente y su efectividad depende en gran medida del tipo, y las condiciones fisiológicas del fruto (Palou *et al.* 2001). Además, las temperaturas que son útiles para reducir el inóculo efectivo están muy próximas a las que causan daños al fruto.

Entre los métodos físicos también pueden incluirse las radiaciones ionizantes y los tratamientos con luz ultravioleta (UV). Las radiaciones ionizantes son rayos  $\gamma$ , rayos  $\beta$  o rayos X. Su aplicación sobre los frutos cítricos es un método curativo que permite controlar los patógenos ya establecidos en el tejido del huésped, tanto los conidios de *P. digitatum* como los de *P. italicum* son altamente sensibles a las radiaciones y (Sommer *et al.* 1964). Los frutos maduros son relativamente resistentes a la irradiación porque en este estado de desarrollo prácticamente ya no hay división celular. La efectividad de esta técnica como tratamiento fungicida depende del tipo de patógeno, su estado de crecimiento y su población en el huésped. El problema es que las dosis mínimas requeridas para un control efectivo, que oscilan entre (1000-1750 Gy), suelen resultar fitotóxicas (Barkai-Golan, 1992). Por ello, una alternativa sería el uso de dosis inferiores en combinación con otros tratamientos complementarios como el calor o fungicidas. También se ha estudiado la exposición a radiación UV. Una exposición a bajas dosis (0,5-8 KJ/m<sup>2</sup>) de una longitud de onda de entre 100-280 nm produce una reducción significativa de la incidencia de las podredumbres verde y azul en diferentes especies de cítricos y cultivares, aunque la efectividad del tratamiento y el riesgo de fitotoxicidad varía con la dosis de radiación y duración, tipo y madurez del fruto y las condiciones de almacenamiento (Kinay *et al.* 2005; Droby *et al.* 1993), por lo que no existe una dosis fija que se pueda recomendar de forma general.

Como tratamientos físicos complementarios a otros tratamientos antifúngicos de postcosecha pueden citarse la conservación frigorífica (a 3-5 °C para naranjas y mandarinas)

y la conservación frigorífica en atmósferas controladas convencionales (5-10 % O<sub>2</sub> + 0-5 % CO<sub>2</sub>), atmósferas con monóxido de carbono (5-10 % CO) (Kader y Arpaia, 2002), atmósferas de baja presión o hipobáricas (75-175 mm Hg) (Spalding y Reeder, 1976) y atmósferas ionizadas (0,1-1,0 ppm O<sub>3</sub>) (Palou *et al.* 2007) y la eliminación de etileno de las zonas de almacenamiento (Wills *et al.* 1999). Estos tratamientos no poseen actividad fungicida por sí solos, pero sí tienen actividad fungistática. Además, ralentizan la actividad metabólica del fruto y retrasan su entrada en senescencia, ayudando a mantener la resistencia del fruto a la infección.

El efecto del ozono (O<sub>3</sub>) en el crecimiento y la virulencia de los hongos patógenos causantes de podredumbres también han sido estudiados. Concentraciones muy bajas de O<sub>3</sub> causan la inhibición del crecimiento del micelio y la esporulación de muchos hongos, incluyendo *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* en zanahorias (Liew y Prange, 1994), fresas (Nadas *et al.* 2003), y uvas (Palou *et al.* 2002), *P. digitatum* en frutos cítricos (Harding, 1968; Palou *et al.* 2001), y *Rhizopus stolonifer* en uvas de mesa (Sarig *et al.* 1996). Desafortunadamente, las concentraciones de O<sub>3</sub> que inactivan los conidios son relativamente altas y no pueden ser usadas sin un total confinamiento del gas y la protección de los trabajadores al mismo. El equipamiento para generar y aplicar altas concentraciones de O<sub>3</sub> se ha desarrollado comercialmente (Tahoe Food Inc., Sparks NV, USA) y es utilizado experimentalmente para el control postcosecha de la podredumbre gris de las uvas causada por *B. cinerea* (Mlikota Gabler *et al.* 2010).

#### **1.3.2.2 Control Químico**

Los productos químicos alternativos a los fungicidas de síntesis tradicionales para el control de las enfermedades postcosecha deben ser sustancias naturales o sintéticas con mínimos efectos sobre el medio ambiente, personas y animales. El origen de estas sustancias alternativas incluye tanto aditivos alimentarios como aquellas sustancias consideradas GRAS (Generally Regarded as Safe) por la "Food and Drug Administration" de los Estados Unidos: componentes naturales obtenidos de plantas, animales y microorganismos (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2007).

Como componentes naturales pueden incluirse los volátiles de las plantas. Especialmente efectivos contra *P. digitatum* y *P. italicum* son los jasmonatos (Droby *et al.* 1999) y algunos componentes del aroma, como acetaldehído, benzaldehído, etanol, etilformato y 2-nonanona (Yuen *et al.* 1995). Las plantas aromáticas, tales como citrus, producen aceites esenciales que básicamente contienen terpenos volátiles tales como el citral, que es un componente antifúngico que representa la primera línea de defensa del flavedo de los frutos cítricos a la infección por *P. digitatum* (Rodov *et al.* 1995). La eficacia *in vitro* del citral depende del método de aplicación pero la aplicación *in vivo* resulto ser fitotóxica y no prometidora (Klieber *et al.* 2002). La segunda línea de defensa descrita en frutos cítricos incluye la síntesis de fitoalexinas, principalmente, cumarinas tales como escoparona, escopoletina y escopolina. Angioni y colaboradores (1998) aislaron una cumarina, 7-

geranoxicumarina, de la piel del pomelo, un componente fenólico que reduce eficazmente la podredumbre y no fue fitotóxico.

El ácido amino aminobutírico (BABA) se ha convertido en una prometedora alternativa natural a los fungicidas de síntesis debido a que produce la inducción de las respuestas de defensa de las plantas (Jakab *et al.* 2001) y a su actividad antifúngica (Tavallali *et al.* 2008). Algunos investigadores han señalado que el BABA podría inhibir el crecimiento de *P. digitatum* (Porat *et al.* 2003), además de otros hongos filamentosos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Marcucci *et al.* 2010) y *Botrytis cinerea* (Fischer *et al.* 2009).

Polvos, geles y extractos de solventes orgánicos de plantas de diferentes orígenes, como *Aloe vera* (Saks y Barkai-Golan, 1995) o *Thymus sp.*, *Cistus sp.* y *Myrtus sp.* (Ameziane *et al.* 2007), también presentan actividad contra *P. digitatum* y *P. italicum* bajo diferentes condiciones experimentales. Además, las plantas y animales producen una amplia variedad de péptidos y pequeñas proteínas con actividad antimicrobiana que forman parte de los mecanismos de defensa contra las infecciones fúngicas. Algunos péptidos poseen actividad antifúngica frente a *P. digitatum* y *P. italicum*, como por ejemplo el hexapéptido sintético PAF26, que es capaz de controlar moderadamente las podredumbres de los cítricos incluso por cepas de hongos patógenos resistentes a otros fungicidas (López-García *et al.* 2002, 2003). Ciertas formulaciones de quitosano, que es un constituyente primario de crustáceos, insectos o las paredes celulares de hongos, tienen actividad antifúngica *in vivo* contra *P. digitatum* o *P. italicum*, reduciendo su actividad en frutos cítricos y retardando la senescencia del fruto durante los largos almacenamientos en frío (El-Ghaouth *et al.* 2000; Benhamou, 2004; Chien *et al.* 2007).

Existe una gran cantidad de aditivos alimentarios como acetatos, sorbatos, benzoatos, propinatos, formatos, cloruros, fosfatos etc. Los mejores resultados para el control *in vivo* de *P. digitatum* en cítricos se obtuvieron con el sorbato potásico y el benzoato sódico (Palou *et al.* 2002). Los tratamientos con carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y el bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) son ampliamente utilizados desde hace años porque son aditivos alimentarios efectivos y baratos permitidos sin ninguna restricción para muchas aplicaciones en la agricultura orgánica (Smilanick *et al.* 1999). El uso de estos aditivos junto con inmersiones prolongadas en soluciones calientes permiten un buen control de las podredumbres de cítricos (Palou *et al.* 2002).

### **1.3.2.3 Control biológico**

El control biológico se basa en la utilización controlada de microorganismos que antagonizan con los microorganismos patógenos.

Diversos microorganismos han demostrado su eficacia en el control de *P. digitatum* y/o de *P. italicum*, como son las levaduras *Candida oleophila* y *Pichia anomala* (Lahlali *et al.* 2004; Droby *et al.* 1998), *C. saitoana* (El Ghaouth *et al.* 2000), *Kloeckera apiculata* (Long *et al.* 2007) *Debaryomyces hansenii* (Singh, 2002), *Metschnikowia fruticola* y *Metschnikowia pulcherrima*

(Kinay y Yildiz, 2008) y *Saccharomycopsis schoenii* (Pimenta et al. 2008); las bacterias *Pantoea agglomerans* (Teixidó et al. 2001; Torres et al. 2007), *Bacillus subtilis* (Obagwu y Korsten, 2003), *Pseudomonas syringae* (Smilanick et al. 1996) y *Pseudomonas cepacia* (Huang et al. 1993); y los hongos *Aureobasidium pullulans* (Wilson y Chalutz, 1989), *Trichoderma viride* (Borras y Aguilar, 1990), *Cryptococcus laurentii* (Zhang et al. 2004) y *Verticillium lecanii* (Benhamou y Brodeur, 2000).

Dependiendo del tipo de antagonista, el patógeno y el fruto huésped, existen diferentes modos de acción que pueden explicar la actividad de biocontrol del microorganismo antagonista: competición por nutrientes y espacio, secreción de antibióticos o la inducción de los mecanismos de defensa del huésped (Wilson y Wisniewski, 1994; Droby et al. 1992). Normalmente, los antagonistas se aplican sobre los frutos cítricos en baño o dréncher como suspensiones acuosas. Algunos se han ensayado como tratamientos precosecha (Droby et al. 1992) y otros como ingredientes activos en recubrimiento del fruto (McGuire, 1994; El-Ghaouth et al. 2001). Un caso atípico son las biofumigaciones de cítricos almacenados con componentes volátiles producidos por el hongo antagonista *Muscodor albus* (Mercier y Smilanick, 2005). Los inconvenientes asociados a la utilización de microorganismos antagonistas son la falta de actividad curativa, la alta variabilidad en los resultados obtenidos y la dificultad de desarrollar formulaciones para su comercialización. A pesar de ello presentan un gran potencial como tratamiento complementario a otros tratamientos ya sean físicos o químicos.

Aunque a nivel experimental se han encontrado y patentado en laboratorios de todo el mundo numerosas levaduras, bacterias y también hongos filamentosos con capacidad antagonista contra las podredumbres verde y azul de los cítricos, únicamente unos pocos productos han sido comercializados: Biosave™ (*Pseudomonas syringae*, Jet harvest solutions, USA), Shemer™ (*Metschnikowia fructicola*, Bayer Crop Science, AG), Pantovital™ (*Pantoea agglomerans*, Biodurcal S.L., Spain), Serenade™ (*Bacillus subtilis*, AgraQuest, USA) y Boniprotect™ (*Aureobasidium pullulans*, Bioprotect, Germany) son algunos de los productos comerciales actualmente existentes.

#### **1.3.2.4 Combinación de tratamientos para el tratamiento integral de enfermedades**

Todos los sistemas alternativos ensayados no cubren el espectro de acción de los fungicidas químicos de síntesis ni son tan consistentes como éstos. Un tratamiento exitoso para el control de las enfermedades postcosecha de frutos debe ser extremadamente eficiente, en el rango del 95-98 %. Por esta razón, actualmente se está evaluando la integración de dos o más sistemas compatibles o complementarios. Tres son los objetivos que deben reunir estos tratamientos: tener un efecto aditivo o sinérgico para aumentar la efectividad o la persistencia de los tratamientos individuales; tener efectos complementarios para combinar actividades curativas y preventivas; y finalmente deben ser aplicables a nivel comercial.

Para reducir el potencial impacto negativo de los tratamientos antifúngicos en la calidad de los frutos cítricos, el curado y los tratamientos de agua caliente han sido combinados con

envases individuales de plástico para la fruta (Rodov *et al.* 2000), radiaciones ionizantes a bajas dosis (Spalding *et al.* 1987; Barkai-Golan *et al.* 1969), tratamientos UV (D'hallewin *et al.* 1994) o breves choques de CO<sub>2</sub> (Palou *et al.* 2008). También han sido ampliamente estudiadas las soluciones acuosas calientes de cualquiera de los fungicidas convencionales (Schirra y Mulas 1995; Schirra *et al.* 1997; 1998) con químicos alternativos de baja toxicidad, tales como carbonato sódico y bicarbonato sódico (Palou *et al.* 2001), sorbato potásico (Smilanick *et al.* 2008), benzoato sódico y molibdato amónico (Palou *et al.* 2002), etanol, dióxido de azufre (Smilanick *et al.* 1995), de forma que aumentan significativamente su efectividad frente a las podredumbres de *Penicillium* y otras enfermedades postcosecha de cítricos. El calor probablemente facilita la captación de los ingredientes activos a través de la cutícula del fruto de un modo similar a como se facilita por los tratamientos por inmersión en comparación con las aplicaciones de "spray" o "drencher" (Brown y Baraka, 1996; Porat *et al.* 2002).

Los tratamientos de calor y la aplicación de los microorganismos antagonistas son tratamientos complementarios que normalmente muestran efectos sinérgicos en el control de las enfermedades postcosecha causadas por *Penicillium*. Entre los microorganismos utilizados se incluyen *C. oleophila* (Lanza *et al.* 2004), *C. famata* (D'hallewin *et al.* 1999), *B. subtilis* (Obagwu *et al.* 2003) y *P. agglomerans* (Plaza *et al.* 2004).

A parte de los tratamientos de calor, también se han desarrollado otros medios físicos de control como son la radiación UV y las atmósferas controladas, que se han combinado con la aplicación de microorganismos antagonistas para el control de las podredumbres verdes y azul de frutos cítricos. La aplicación de radiación UV en combinación con la levadura antagonista *D. hansenii* inhibe completamente el desarrollo de *P. digitatum* en mandarinas Dancy (Stevens *et al.* 1997). También se han estudiado combinaciones con los fungicidas convencionales, como es el tiabendazol, el cual empleado a una concentración de 200 µg/mL en combinación con *C. oleophila* tiene los mismos efectos en el control de las podredumbres en frutos cítricos que los obtenidos con el tratamiento comercial de tiabendazol, que normalmente se usa en unas concentraciones superiores (Droby *et al.* 1998). Combinaciones con otros químicos de baja toxicidad como el etanol (Lanza *et al.* 2004) o el ácido oxálico (Arras *et al.* 2008) también aumentan la eficacia del biocontrol contra *P. digitatum* y *P. italicum*. El cloruro de calcio en frutos cítricos aumenta el efecto del antagonista *P. guilliermondii* y también reduce la población de levaduras requeridas para obtener un control efectivo (Droby *et al.* 2002). Sin embargo el carbonato sódico y el bicarbonato sódico son los aditivos que han sido más ampliamente evaluados por su actividad sinérgica con microorganismos antagonistas. La combinación de estos componentes con *P. syringae* (Smilanick *et al.* 1999), *P. agglomerans* (Usall *et al.* 2008), *C. oleophila* (Lanza *et al.* 2004), *B. subtilis* (Obagwu *et al.* 2003) y *C. laurentii* (Zhang *et al.* 2004) produjo mejores resultados que los tratamiendo individuales en el control de las podredumbres verde y azul en diferentes especies de cítricos y cultivares.

La aplicación de microorganismos de biocontrol o sustancias naturales en postcosecha sólo ha tenido resultados preventivos, por lo que el control de los patógenos postcosecha no

puede basarse solamente en la aplicación de estas estrategias, sino en la combinación de prácticas apropiadas, tales como métodos de recolección y manejo de fruta que minimicen la contaminación y aparición de heridas, métodos de desinfección superficial que impidan la contaminación cruzada de la fruta en la línea de confección y el uso de sustancias naturales que potencien la acción de los microorganismos antagonistas y tengan acción curativa sobre infecciones ya establecidas.

## **2. Biología de *Penicillium digitatum***

Como ya se ha comentado, *Penicillium digitatum* es el agente causal de la podredumbre verde de los frutos cítricos y constituye uno de los patógenos más importantes durante la postcosecha de los mismos, llegando a causar hasta el 80 % de las podredumbres. A pesar de la importancia económica de este patógeno nuestro conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad/ virulencia son muy escasos, en contraste con el avance experimentado en los últimos años en el conocimiento de las respuestas de defensa del fruto a la infección por este patógeno.

*P. digitatum* es un patógeno específico de frutos cítricos; no se ha descrito en otros sistemas vegetales. Como se ha mencionado anteriormente, es un patógeno de herida. A medida que aumenta la profundidad de la herida en el albedo (tejido interno de la corteza) mayor es la probabilidad de que se desarrolle la infección (Kavanagh y Wood, 1967), mientras que en heridas que sólo afectan al flavedo (tejido externo de la corteza) la probabilidad de desarrollo de la infección es muy inferior. Sin embargo, si la herida afecta a las glándulas de aceite es más fácil que se desarrolle la infección (Rodov *et al.* 1995). Este efecto ya fue visto por French y colaboradores (1977) que observaron que las esporas de *P. digitatum* y de *P. italicum* germinaban más rápidamente en suspensiones de aceites de glándulas de naranja, limón o lima que en citral, nonanal, decanal por separado o en una mezcla de los mismos. Eckert y Ratnayake (1994) comprobaron que los compuestos volátiles que desprenden los frutos cítricos inducen la germinación de las esporas, facilitando el inicio del proceso infectivo. La combinación de limoneno, acetaldehídos, etanol y CO<sub>2</sub> en conjunto estimulan la germinación, pero cada componente individualmente no tiene efecto. Sin embargo Droby y colaboradores (2008) demostraron que los monoterpenos presentes en la piel de los cítricos limoneno, mirceno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno promueven la germinación de conidios de *P. digitatum* y *P. italicum* en ausencia de nutrientes. Además, estos terpenos ejercen un efecto inhibitorio contra otros hongos no-patógenos de cítricos, como *P. expansum* y *B. cinerea*, lo que sugiere que estos monoterpenos volátiles, en especial el limoneno, actúan como las principales moléculas de señalización de reconocimiento del huésped por *P. digitatum* y *P. italicum*. Otro aspecto que ha sido objeto de estudio es la relación existente entre la hormona vegetal etileno y *P. digitatum*. El etileno actúa desencadenando la maduración de los frutos climatéricos, a la vez que acelera el proceso de senescencia. Aun cuando los cítricos son frutos no climatéricos, el etileno actúa acelerando el cambio de color del flavedo, hecho que es utilizado comercialmente en la desverdización de los frutos al inicio de la campaña. En la infección por *P. digitatum* sobre frutos cítricos la producción de etileno durante los primeros estadios del desarrollo de la infección proviene del fruto. Sin embargo, conforme



avanza la infección, el hongo es el responsable de prácticamente la totalidad de la producción de etileno en estadios más avanzados (Achilea *et al.* 1985a; Achilea *et al.* 1985b). El razonamiento propuesto es que la producción de etileno aceleraría el proceso de senescencia del fruto, favoreciendo así el desarrollo del patógeno. Sin embargo, un mutante de *P. digitatum* que produce bajos niveles de etileno es capaz de infectar tan eficientemente como una cepa productora de la hormona, indicando que la producción de etileno no representa un mecanismo de patogenicidad (Mattoo *et al.* 1979). Además, si se bloquea la percepción de etileno en los frutos mediante aplicación de 1-metil ciclopropeno no sólo no se observa una disminución de la infección, si no que se produce un ligero aumento en la incidencia natural de frutos podridos (Marcos *et al.* 2005; Porat *et al.* 1999).

En general, los patógenos han desarrollado varios mecanismos para aumentar su virulencia, sin embargo, aún desconocemos cuales son los factores de virulencia en los hongos patógenos de postcosecha, incluyendo los mecanismos por los que pueden suprimir las defensas del fruto y la eficiencia de los mismos, especialmente en la interacción *Penicillium*-fruto. Una de las hipótesis es la de que podrían suprimir la vía de fenilpropanoides. La fenilalanina amonio liasa (PAL) es la primera enzima de esta ruta, siendo una enzima clave de la misma (Dixon y Paiva, 1995). Las primeras evidencias de que *P. digitatum* era capaz de suprimir las defensas del fruto fue proporcionada por Ismail y Brown (1979) quienes observaron que el aumento de la actividad de PAL en la piel de los cítricos, inducido por una herida mecánica, era inhibida alrededor de las zonas inoculadas con el hongo. Lisker y colaboradores (1983) más tarde demostraron que la actividad PAL es también suprimida en áreas distantes de los sitios de inoculación. También observaron que la infección por *P. digitatum* es capaz de inhibir la inducción de PAL por etileno en frutos intactos o en aquellos en los que se ha producido una herida mecánicamente. La expresión del gen que codifica PAL está inducida en frutos cítricos durante el proceso de infección por *P. digitatum* en la zona próxima a la inoculación, sin embargo no se ha observado en frutos sanos (McCollum, 2000). Más recientemente, Ballester y colaboradores (2006) han demostrado que esta supresión tiene lugar a nivel post-transcripcional porque la expresión del gen *PAL* de cítricos fue claramente inducida en respuesta al ataque del patógeno, pero no se reflejó en la inducción de la actividad PAL.

Sin embargo, el factor más estudiado en relación a los mecanismos de patogenicidad de hongos patógenos postcosecha es la modificación o adaptación del patógeno al ambiente del huésped adaptándolo a sus necesidades para su beneficio propio. En la interacción planta-patógeno el pH del tejido de la planta es uno de los factores ambientales que tiene un mayor efecto. En frutos el pH es importante porque afecta a la germinación de los conidios (Pelser *et al.* 1977), tiene influencia en la colonización de los tejidos del huésped y en la virulencia de los patógenos (Prusky *et al.* 2004, Prusky y Yakoby, 2003). Algunas especies de hongos patógenos pueden aumentar su virulencia mediante una variación local del pH del huésped, aumentándolo o disminuyéndolo. En las especies de *Penicillium*, la colonización produce una acidificación de los tejidos del fruto que infectan (Prusky *et al.* 2004). En nuestro grupo del IATA hemos comprobado que el flavedo macerado de frutos de naranja 'Navelina' infectados por *P. digitatum* presentaba un pH 2,2 unidades inferior al de una zona sana lejana al frente

de maceración (resultados no publicados). En la infección de manzanas por *P. expansum* la disminución del pH es menos marcada, aunque se ha demostrado que se produce una disminución de 0,4-0,5 unidades (Sánchez-Torres y González-Candelas, 2003). Prusky y colaboradores (2004) han sugerido que *P. digitatum* compromete las defensas de los frutos cítricos mediante la acidificación del tejido, especulando que el bajo pH del ambiente es óptimo para la expresión y la funcionalidad de las poligalacturonasas fúngicas. Además, demostraron que durante el desarrollo de la enfermedad *P. digitatum* produce ácido cítrico y ácido glucónico y captura activamente iones de amoníaco y que estos dos procesos están asociados con la patogenicidad. Estas observaciones ya fueron propuestas en los años 70 con los estudios de Barash y Angel (1970) y Barmore y Brown (1979) sugiriendo que durante la invasión de frutos cítricos por *P. digitatum* se producía una disminución del pH, aunque en este caso estaba asociada a la producción de ácido galacturónico. Hasta la fecha la controversia entre cual de los dos (ácido glucónico o ácido galacturónico) es el responsable de la acidificación no está resuelta. Sin embargo, en la interacción *P. expansum*- manzana, Hadas y colaboradores (2007) han demostrado que el ácido glucónico es un factor fundamental que contribuye a la enfermedad de la manzana por el hongo. La acidificación del tejido por este ácido aumenta la expresión de las enzimas pectinolíticas y el establecimiento de las condiciones para el desarrollo de este hongo.

Otro factor que también ha sido objeto de estudio en la interacción fruto-patógeno postcosecha ha sido el rol de los sistemas antioxidantes. En la interacción planta-hongo patógeno, se ha demostrado que la generación masiva de ROS dentro de las células del huésped contribuye a la defensa del mismo (Lamb y Dixon, 1997). Existen diferentes actividades enzimáticas, como superóxido dismutasa y catalasa, implicadas en la regulación de las ROS que juegan un importante papel en la resistencia a patógenos (Mittler, 2002). Torres y colaboradores (2003) realizaron ensayos con dos tipos de frutos de manzana, los menos susceptibles a la infección por *P. expansum* mostraron un incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> junto con una alta actividad superóxido dismutasa (SOD), sin cambios significativos en los niveles de catalasa (CAT) o peroxidasa (POX). En los frutos susceptibles, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SOD fueron similares a los de los frutos control. En contraste, la actividad CAT y POX se incrementó significativamente como consecuencia de la herida y la inoculación. Por lo tanto, estos autores sugirieron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el metabolismo asociado inducido por la herida podrían jugar un importante papel en los mecanismos de resistencia de manzanas a *P. expansum*. Macarasin y colaboradores (2007) han demostrado que durante la infección de frutos de naranja, *P. digitatum* es capaz de suprimir la acumulación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células del fruto, mientras que un no patógeno, como *P. expansum*, desencadena una acumulación masiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el exocarpo del fruto. Para colonizar con éxito el fruto, *P. digitatum* necesita superar los mecanismos de defensa del fruto. Droby y colaboradores (2008) sugieren que el ácido cítrico juega un papel en la patogénesis de *P. digitatum* ya que inhibe la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, otros ácidos como el ácido glucónico inducen la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ballester y colaboradores (2006) han analizado la distribución espacial de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, peroxidasa) en frutos cítricos infectados por *P. digitatum*, comprobando que todas las actividades enzimáticas decrecen a medida que el patógeno progresa a través

del tejido, pero siguiendo cinéticas diferentes, excepto en la catalasa y la peroxidasa solubles, que muestran un ligero incremento en el tejido macerado. Torres y colaboradores (2011) sugieren también que *P. digitatum* suprime la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> así como las actividades SOD y CAT producidas en los tejidos de naranja como respuesta al proceso de infección. En contraposición, el empleo del agente de biocontrol *P. agglomerans* CPA-2 activa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ambas actividades enzimáticas, probablemente como un mecanismo para prevenir al fruto contra futuras infecciones.

En *P. digitatum* se han caracterizado parcialmente algunas enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, fundamentalmente pectinasas. El análisis de tres pectinasas, una poligalacturonasa, una pectin metil-esterasa y una pectin liasa, obtenidas a partir de sobrenadantes de medios de cultivo de *P. digitatum* mostró que la única con capacidad de macerar tejido de naranja era la pectin liasa (Bush y Codner, 1968). Sin embargo, nunca se ha detectado esta actividad en tejido macerado. Posteriormente se comprobó que la única actividad pectinasa detectable en frutos de limón infectados por *P. digitatum* era exopoligalacturonasa (Barash y Angel, 1970). Estos autores propusieron que esta actividad era la principal, sino la única, implicada en la maceración del tejido. Además, al tratarse de una actividad de tipo exo, podría explicar perfectamente el aumento de ácido galacturónico que se observa en el tejido macerado. En tejido macerado de naranja infectada por *P. digitatum* la única actividad detectada fue también una exopoligalacturonasa que hidroliza la pectina de la pared celular formando monómeros de ácido galacturónico y que demostró ser capaz de macerar discos de albedo de naranja (Barmore y Brown, 1979). Con posterioridad a esta fecha no hay ninguna referencia bibliográfica acerca de las pectinasas de *P. digitatum*. Más recientemente, se comprobó la presencia de actividad celulasa en frutos de naranja infectados con *P. digitatum*, incluso antes de que los síntomas de la infección fuesen evidentes (Barkai-Golan y Karadavid, 1991), pero no se presentó ninguna evidencia que sugiriera la implicación de esta actividad en patogénesis.

La inmensa mayoría de los estudios moleculares llevados a cabo en *P. digitatum* están relacionados con la resistencia a fungicidas. Los fungicidas del tipo DMIs constituyen uno de los grupos más importantes de fungicidas, entre los que destaca el imazalil. Desde su introducción en 1981, se han descubierto muchas cepas de *P. digitatum* resistentes (Eckert *et al.* 1994; Wild, 1994; Holmes y Eckert, 1995). El mecanismo de resistencia a DMIs más común es la aparición de mutaciones en el gen *CYP51*, que codifica la citocromo P450 esteroles 14 alfa-demetilasa. Hamamoto y colaboradores (2000) aislaron este gen de *P. digitatum* (*PdCYP51*) y todas las cepas resistentes que analizaron tenían una repetición en tandem de cinco copias de una secuencia de 126 pb, mientras todas las sensibles sólo presentaban una copia. Esta secuencia de 126 pb puede actuar como potenciador de la transcripción aumentando el nivel de expresión de *PdCYP51* y por lo tanto, confiere resistencia a DMIs. Más recientemente, Sun y colaboradores (2011) han caracterizado otros dos nuevos genes de *P. digitatum* de la familia CYP51 (*PdCYP51B* y *PdCYP51C*), concluyendo que estos dos genes junto con el ya conocido *PdCYP51A* (previamente *PdCYP51*) forman la familia de genes CYP51 de *P. digitatum*. El gen *PdCYP51B* está involucrado en la resistencia a DMIs por la presencia de una única inserción de 199 pb en la región promotora que resulta en la

sobreexpresión del mismo. Con respecto a *PdCYP51C* no se han detectado cambios consistentes en la secuencia de nucleótidos o en los niveles de expresión que se relacionen con la resistencia a imazalil.

Otro mecanismo para prevenir o reducir la acumulación de fungicidas DMIs dentro de las células y por lo tanto, la reducción o eliminación de su acción tóxica, se basa en la expulsión activa de estos compuestos por los transportadores del tipo ABC o MFS. En *P. digitatum* han sido clonados y secuenciados cuatro genes que codifican transportadores ABC [*PMR1* (Nakaune *et al.* 1998), *PMR3* (AB164459.1), *PMR4* (AB164460.1) y *PMR5* (Nakaune *et al.* 2002)]. Hamamoto y colaboradores (2001) observaron que la disrupción de *PMR1* en una cepa de *P. digitatum* resistente a DMIs produjo una disminución en su resistencia y además el nivel de expresión era ligeramente superior respecto a las cepas sensibles. Otro de los genes estudiados es *PMR5*. Este gen presenta gran homología con *PMR1*, y también con *atrB* de *A. nidulans* y *BcAtrB* de *B. cinerea* (Schoonbeek *et al.* 2003); sin embargo, se induce fuertemente por benzimidazoles, resveratrol y otros compuestos, pero no por DMIs. Ambos genes están involucrados en la resistencia a fungicidas e incrementan su expresión en presencia de diferentes componentes tóxicos (Nakaune *et al.* 1998, 2002). Sánchez-Torres y Tuset (2011) evaluaron la sensibilidad de 75 cepas de *P. digitatum* a siete fungicidas diferentes a través de la caracterización molecular de diferentes genes implicados en la resistencia a fungicidas. Las conclusiones de estos ensayos fueron que muchos genes están involucrados en los mecanismos que confieren resistencia a fungicidas en *P. digitatum*. En algunos casos, la resistencia a un fungicida en particular es determinado por cambios en un solo gen, pero en muchos casos, diferentes mecanismos tales como mutaciones que alteren la diana de los fungicidas o cambios en la transcripción, están involucrados en el desarrollo de resistencia a componentes tóxicos específicos. En los que respecta al otro tipo de transportadores (MFS) hasta la fecha solamente ha sido descrito uno en *P. digitatum* (*PdMFS1* GU124565.1), y los resultados obtenidos mostraron que este transportador es capaz de bombear imazalil fuera de las células, lo que contribuye a la resistencia parcial a imazalil (Wang *et al.* 2012). Estos autores también mostraron que este gen también está implicado en la virulencia de *P. digitatum* sobre frutos cítricos.

Junto con el imazalil, el tiabendazol es el otro fungicida más comúnmente utilizado para evitar la podredumbre verde causada por *P. digitatum*. El tiabendazol pertenece al grupo de los benzimidazoles. Los benzimidazoles se unen a la molécula de  $\beta$ -tubulina interrumpiendo el ensamblaje de los microtúbulos e interfiriendo con la división celular durante la mitosis. La resistencia a este tipo de fungicidas se ha detectado en muchas especies de hongos y al igual que en *P. digitatum* la resistencia está relacionada con una mutación puntual en el gen de la  $\beta$ -tubulina que produce una alteración de la secuencia de amino ácidos en el sitio de unión del benzimidazol. En *P. digitatum* se han identificado dos mutaciones en aminoácidos específicos que confieren resistencia a los benzimidazoles, una en el codón del amino ácido de la posición 198 (Koenraadt *et al.* 1992) y otra en el 200 donde Schmidt y colaboradores (2006) descubrieron que la mutación en todas las cepas resistentes de *P. digitatum* del estudio poseían esta mutación donde la timina era remplazada por una adenina (TTC por TAC), lo que produce un cambio de fenilalanina a tirosina. Este resultado se ha confirmado

en estudios posteriores con otras colecciones de aislados de *P. digitatum* (Kinay *et al.* 2007; Sanchez-Torres y Tuset, 2011).

Para un mejor entendimiento de las bases genéticas de la patogenicidad y, por lo tanto, para facilitar el diseño de nuevas estrategias para el control de la enfermedad, se requiere un eficiente sistema de transformación como una herramienta esencial para la manipulación de genes y poder así abordar estudios de genómica funcional en *P. digitatum*. La transformación mediante la utilización de protoplastos ha sido utilizada con éxito en *P. digitatum* en varios estudios (Nakaune *et al.* 1998; 2002; Hamamoto *et al.* 2001). La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) de conidios germinados es una forma eficiente para evitar la costosa preparación de protoplastos (Song *et al.* 2004). Durante el transcurso de esta Tesis Wang y Li, (2008) han descrito la transformación de *P. digitatum* mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* obteniendo más de 60 transformantes a partir de  $10^6$  conidios. Estos resultados hacen de la ATMT una alternativa muy viable para la manipulación genética de este hongo.

Muy recientemente, nuestro grupo del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) ha participado en la publicación de la secuencia del genoma de dos cepas de *P. digitatum* (Marcet-Houben *et al.* 2012), una de las cuales es la cepa Pd1 (CECT20795), que es con la que se ha trabajado en esta Tesis. El tamaño del genoma se ha estimado alrededor de 26 Mb, lo que supone una notable reducción en comparación con el genoma de *P. chrysogenum* (van den Berg *et al.* 2008), que es el hongo filogenéticamente más cercano con genoma secuenciado. Este avance va a permitir profundizar en la comprensión de los mecanismos fisiológicos de este fitopatógeno. Además, la disponibilidad de la totalidad de los genes es un excelente complemento para los datos obtenidos en esta Tesis que permitirá también un mejor entendimiento de la relación *P. digitatum*-huésped. Dos son los aspectos fundamentales que se podrán abordar. Uno es la especificidad de huésped, ya que como se ha comentado anteriormente *P. digitatum* sólo se encuentra de forma natural infectando frutos cítricos. El segundo aspecto es el relacionado con los mecanismos de patogenicidad de este hongo, incluyendo tanto los mecanismos que le permiten degradar los tejidos del fruto como los mecanismos que emplea para suprimir las respuestas de defensa del mismo.

A pesar de la importancia económica de *P. digitatum* el conocimiento actual de los mecanismos de patogenicidad de este hongo es muy limitado, como ha quedado patente en los párrafos anteriores. Por ello, debemos basarnos en el conocimiento adquirido en otros hongos fitopatógenos como punto de partida para poder profundizar en la biología de este patógeno.

### **3. Interacción planta-patógeno**

Como parásitos, los microorganismos fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes del huésped evadiendo o contrarrestando los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos que sólo son capaces de desarrollarse y reproducirse en tejidos de huéspedes

vivos son llamados biótrofos. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula huésped viva y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles. Entre los patógenos biotróficos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados, tales como las royas. Otro tipo de patógenos, denominados necrótrofos (por ejemplo, *Botrytis* y *Fusarium*), producen la muerte de las células huésped obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Estos pueden utilizar toxinas para matar al huésped o bien son capaces de degradar el tejido de la planta (Collinge *et al.* 2001). Los patógenos hemibiotrófos (por ejemplo, *Phytophthora* y *Colletotrichum*) son intermedios entre los biótrofos y necrótrofos. Presentan un periodo inicial de comportamiento biótrofo, donde invaden células vivas y utilizan su actividad metabólica a favor de su crecimiento y reproducción, al que sigue el establecimiento de un comportamiento necrótrofo, matando las células colindantes (Perfect y Green, 2001).

Hace más de 40 años las investigaciones pioneras de Harold Flor (1971) sobre las interacciones planta-patógeno culminaron en la hipótesis del modelo gen-a-gen. Esta hipótesis postula que por todo gen dominante de avirulencia (*Avr*) en el patógeno, hay un gen de resistencia en el huésped (*R*) y que la interacción entre el producto de estos genes conlleva la activación de las respuestas de defensa del huésped, tales como las respuesta de hipersensibilidad (RH). En los últimos años se han identificado numerosos genes *Avr* y genes *R* s, lo que ha supuesto un salto cualitativo en nuestro conocimiento a nivel molecular de las interacciones planta-patógeno.

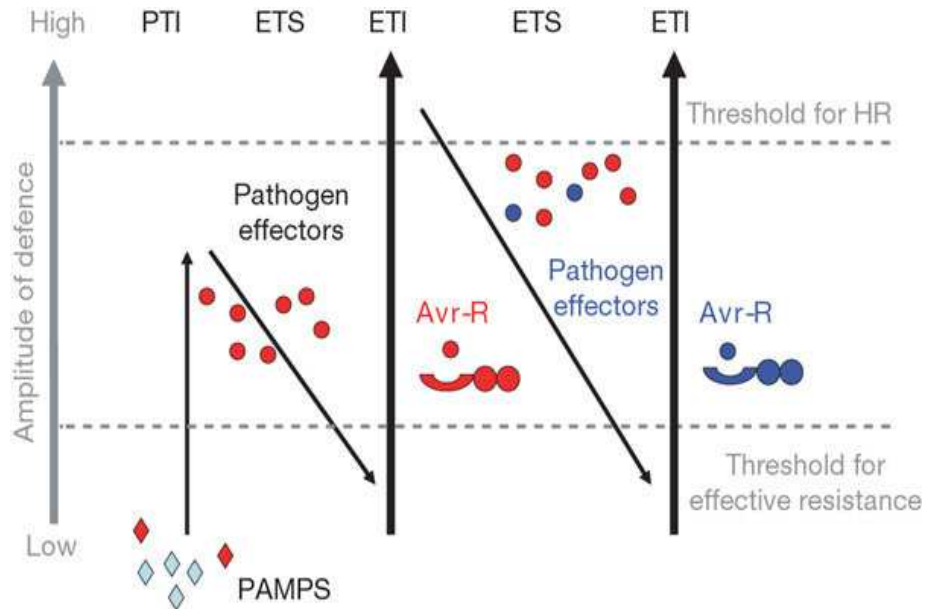
Para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tener en cuenta los dos componentes del sistema. En otras palabras, se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del huésped. Para dar la importancia adecuada a la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos interacción compatible e interacción incompatible. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando ciertas variedades del huésped son resistentes a ciertas razas del patógeno. Las interacciones incompatibles (huésped resistente, patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible (Heath, 2000). Por el contrario, en las interacciones compatibles (huésped susceptible, patógeno virulento), el reconocimiento no se lleva a cabo o lo hace tardíamente, de forma que la respuesta de defensa no es activada a un nivel suficiente para contener al patógeno y se establece la enfermedad (De Wit, 1992).

La interacción patógeno-no huésped es la forma más común de resistencia a la enfermedad exhibida por las plantas contra la mayoría de los microorganismos potencialmente patógenos. Recientemente, se han identificado varios componentes de la resistencia a la enfermedad no huésped. Este tipo de resistencia exhibida contra bacterias, hongos y oomicetos puede ser de dos tipos. Tipo I, se denomina al tipo de resistencia que no produce

ningún tipo de síntomas visibles mientras que la resistencia de tipo II desencadena una rápida respuesta hipersensible que resulta en muerte celular. Existen varias similitudes entre la resistencia patógeno-no huésped y la resistencia gen por gen pero aún no está claro si el mismo mecanismo está involucrado en la producción de estas respuestas de resistencia (Heath, 2000; Mysore y Ryu, 2004).

Las plantas desarrollan dos líneas activas de defensa en respuesta al ataque por un patógeno. La primera línea proporciona una defensa basal contra todos los patógenos potenciales y está basada en el reconocimiento de patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMPs, del inglés: *pathogen associated molecular patterns*) mediante receptores que reconocen estos patrones (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptors*). Estos receptores se encuentran generalmente en la superficie de las células vegetales y activan la inmunidad producida por PAMPs (PTI, siglas de PAMP-triggered immunity), previniendo la colonización del huésped (Wit, 2007; Jones y Dangl, 2006). Ahora existen evidencias de que algunos genes *Avr* codifican efectores que suprimen la PTI, permitiendo al patógeno infectar a la planta y causar la enfermedad. Una vez que el sistema basal de defensa de las plantas ha sido sobrepasado por los patógenos, durante la evolución de las plantas han respondido con el desarrollo de un segundo sistema de reconocimiento basado en la percepción de efectores por proteínas R y una subsecuente activación de la inmunidad activada por efectores (ETI, del inglés: *effector-triggered immunity*) lo que conduce a una rápida y aumentada respuesta de defensa en las plantas. Esta segunda línea de defensa condujo a su vez a una segunda ola de co-evolución planta-patógeno durante la cual los patógenos respondieron mediante la mutación de los efectores o el desarrollo de nuevos efectores que podían evitar o suprimir la ETI, mientras que las plantas desarrollaron nuevas proteínas R para mediar el reconocimiento de estos nuevos efectores. En la interacción molecular entre los hongos necrótrofos y sus plantas huéspedes se supone que éstos no cumplen con el modelo de gen-a-gen, sin embargo, recientemente, se ha demostrado que algunos hongos necrótrofos producen proteínas ribosomales que podrían funcionar como efectores e inducir la necrosis en plantas para facilitar la enfermedad (Friesen *et al.* 2009).

Jones y Dangl (2006) plantearon que la respuesta del sistema inmune en las plantas podía ser representada en un modelo zigzag de cuatro fases (Figura 1). En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en la activación de la PTI, que puede detener la colonización adicional del tejido vegetal. En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia, lo que resulta en una ETS (del inglés: *effector triggered susceptibility*). En la fase 3, determinados efectores son reconocidos por una de las proteínas NB-LRR, resultando en la activación de la ETI, la cual es una respuesta acelerada y amplificada de PTI. En la fase 4, la selección natural conduce al patógeno a evitar la ETI eliminando o diversificando el gen efector reconocido o adquiriendo determinantes antigénicos o efectores adicionales, que les permiten evadir la ETI.



**Figura 1.** Modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas (Jones y Dangl, 2006).

Una vez que el patógeno ha sido reconocido por la planta se activan una serie de mecanismos de defensa que son los responsables de la resistencia. Durante la infección se pueden activar los genes de resistencia (genes *R*) que pueden funcionar para impedir el desarrollo del patógeno. Sin embargo, cuando un patógeno avirulento infecta una planta, con frecuencia provoca una muerte rápida de células y la síntesis de compuestos antimicrobianos en el sitio de infección, que restringen el crecimiento del patógeno (Dong, 1995). Entre las respuestas de defensa se encuentra el rápido flujo de iones, el estrés oxidativo extracelular, la reprogramación transcripcional dentro y alrededor de los sitios de infección y en la mayoría de los casos la respuesta hipersensible (Nimchuk *et al.* 2003). La respuesta hipersensible produce una zona de células muertas alrededor del sitio de infección, tiene lugar la síntesis de ácido salicílico y una acumulación de agentes antimicrobianos, como las proteínas PR (quitinasas y glucanasas) o compuestos fenólicos como las fitoalexinas (Hammond-Kosack y Jones, 1996). En algunos casos puede darse también la deposición de calosa en el sitio de infección como medio para reforzar la pared celular (Vogel *et al.* 2002).



Las proteínas PR se han detectado e identificado en una amplia variedad de plantas y se clasifican de acuerdo a su actividad. Hasta la fecha se conocen 17 grupos diferentes. Entre ellas, las proteínas PR2, que son glucanasas, cuya actividad es degradar el principal componente de la pared celular de hongos, aunque contribuyen a la resistencia por liberar fragmentos glicosídicos de la pared celular de la planta o del patógeno, que actúan como inductores de la respuesta de defensa. Varias familias de proteínas PR presentan actividad quitinasa (PR3, PR8 y PR11), que actúan en respuesta de defensa en forma sinérgica con las glucanasas. Las PR7 son endoproteinasas y las PR10 son ribonucleasas (van Loon *et al.* 2006). Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular, en cuya síntesis intervienen enzimas como chalcona sintasa (CHS), flavanona-3-hidroxilasa (F3H) y fenilalanil-amonioliasa (PAL), que son consideradas como proteínas relacionadas con el mecanismo de defensa (Ahuja *et al.* 2012). Finalmente, otras proteínas de defensa como las enzimas del estrés oxidativo o las que intervienen en la lignificación también tienen un importante papel en la defensa del huésped frente a la invasión de patógenos (Bhuiyan *et al.* 2009). Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal o poligénica. Los mecanismos de defensa de la resistencia horizontal, ya sea la producción de fitoalexinas, proteínas PR, deposición de lignina, reacción hipersensible; son los responsables de actuar en detrimento del patógeno invasor. En otras palabras, la defensa en plantas es básicamente poligénica (van Loon *et al.* 2006).

#### **4. Factores de patogenicidad y virulencia en hongos fitopatógenos**

De acuerdo con la convención adoptada por la “American Phytopathological Society”, en esta Tesis se emplea el término patogenicidad para designar la habilidad de un patógeno para causar enfermedad en un huésped particular (una propiedad cualitativa), mientras que el término virulencia hace referencia al grado de daño causado por el patógeno en el huésped (una propiedad cuantitativa) (Sacristán y García-Arenal, 2008). Para causar la enfermedad los hongos patógenos poseen un arsenal de “factores de virulencia”, los cuales se despliegan espacial y temporalmente determinando el potencial de patogénesis básico y la magnitud de la infección, respectivamente (Ortoneda *et al.* 2004). Los factores de virulencia agrupan cualquier factor que contribuya a la penetración, invasión, colonización y maceración de un tejido vegetal vivo, mientras que los factores de patogenicidad determinan la capacidad de un patógeno de infectar un determinado huésped.

##### **4.1 Reconocimiento del huésped y cascadas de transducción de señales**

El éxito de un hongo patógeno depende en gran medida de su capacidad para percibir y responder a las señales generadas por la planta, especialmente en las etapas muy tempranas de la infección (el reconocimiento), aunque también en etapas posteriores. A pesar del creciente número de genes clonados pertenecientes a componentes de las rutas de transducción de señal, los acontecimientos iniciales de la detección de señales extracelulares y transducción en una señal intracelular son aún poco conocidos. Las cascadas de señalización mediadas por genes que codifican proteínas tales como proteínas G

heterotriméricas, proteínas MAP kinasas (Mitogen Activated Protein) y proteínas dependientes de AMP cíclico han sido objeto de estudio en varias revisiones (Xu, 2000; Román *et al.* 2007; Li *et al.* 2007).

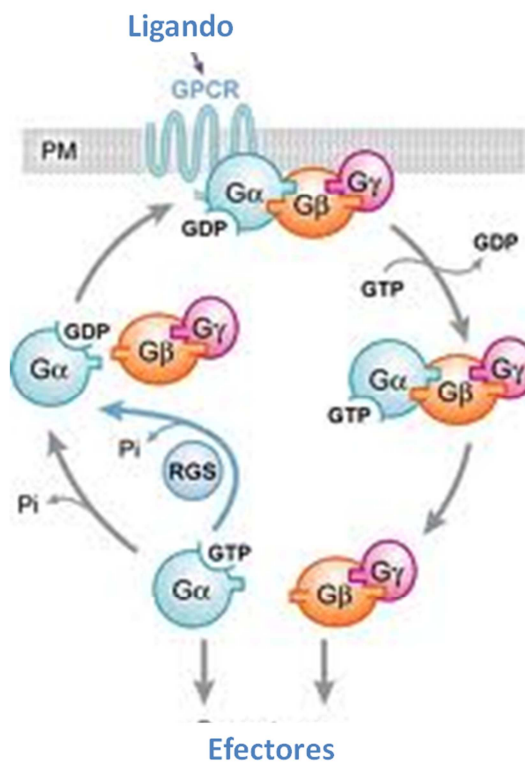
La disrupción de estos genes de señalización resulta en la pérdida de y/o reducción en la patogenicidad, así como efectos pleiotrópicos en procesos celulares, incluyendo reproducción sexual, conidiación, crecimiento y producción de toxinas. En consecuencia, es difícil determinar qué aspecto de la fisiología de los hongos es responsable de la pérdida de la patogenicidad. El interés especial en estos genes surge de su papel en virulencia, de ahí que los componentes de estas cascadas de señalización pueden representar una diana para el desarrollo de drogas antifúngicas (Lengeler *et al.* 2000).

En muchos hongos, la adaptación a la disponibilidad de nutrientes y el estrés se ha relacionado con la vía de señalización dependiente de AMP cíclico (**cAMP**). Además, esta vía controla la diferenciación, el desarrollo sexual y la virulencia (Mehrabi y Kema, 2006; Yamauchi *et al.* 2004). El cAMP funciona activando la proteína quinasa A o PKA, también conocida como proteína quinasa dependiente de cAMP. La PKA es una holoenzima formada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. A bajas concentraciones de cAMP, la holoenzima permanece intacta y las subunidades catalíticas permanecen unidas a las subunidades reguladoras. A altas concentraciones de cAMP, éste se une a las subunidades reguladoras. Al unirse provoca un cambio conformacional en las subunidades reguladoras que liberan las subunidades catalíticas exponiendo así el sitio activo. Las subunidades catalíticas transfieren el grupo fosfato terminal del ATP a residuos serina o treonina de sustratos proteicos. Esta fosforilación produce un cambio de la actividad del sustrato (Borges-Walmsley *et al.* 2000). En *Ustilago maydis* se ha demostrado que la PKA regula la transición dimórfica y la patogénesis (Dürrenberger *et al.* 1998). En este hongo, los genes *adr1* y *uka1* codifican las subunidades catalíticas de PKA. Mutantes nulos en *adr1* muestran crecimiento filamentoso, en contraposición al crecimiento levaduriforme de las líneas haploides de la cepa silvestre. Además, las cepas diploides homocigóticas  $\Delta$ *adr1* no son capaces de causar enfermedad. En contraste, la eliminación del gen *uka1* no tiene efecto sobre la virulencia (Dürrenberger *et al.* 1998). En *M. grisea*, el gen *cpkA* está implicado en el desarrollo del apresorio y en la penetración en el huésped y es indispensable para el crecimiento durante la infección. Mutantes defectivos en el gen *cpkA* mostraron retraso en la formación del apresorio, además de tener un tamaño menor comparado con los de la cepa silvestre y ser defectivos en la penetración de las células de la planta. Sin embargo, eran capaces de causar lesión cuando se inoculó a través de heridas, sugiriendo un papel adicional del cAMP en la detección de la superficie en *M. grisea* (Xu *et al.* 1997). El mutante  $\Delta$ *cpkA* de *Colletotrichum trifolii* mostró un fenotipo similar al de *M. grisea* durante la penetración del tejido de la hoja y el crecimiento durante la infección (Yang y Dickman, 1999). PKA también regula la virulencia en *Mycosphaerella graminicola*, un patógeno fúngico que no forma apresorios para la infección, sino que penetra a través de los estomas. La eliminación de las subunidades reguladora (*MgBcy1*) o de la catalítica (*MgTpk2*) resulta en mutantes que muestran una disminución en su virulencia y son incapaces de producir picnidios en las hojas infectadas (Mehrabi y Kema, 2006). En *Sclerotinia sclerotiorum* se ha correlacionado el

incremento de los niveles de la actividad PKA con la iniciación de la producción de esclerocios; sin embargo, la eliminación del gen *pka1*, que codifica la subunidad reguladora, no tuvo efectos en la patogenicidad o en la producción de microesclerocios (Jurick *et al.* 2004), por lo que estos autores postulan la existencia de otro gen (*pka2*) que codificaría la proteína responsable de la mayor parte la actividad PKA de la célula. En *Verticillium dahliae*, que produce marchitamiento vascular en un amplio rango de huéspedes, la capacidad para causar enfermedad en los mutantes defectivos en el gen que codifica la subunidad catalítica de la proteína PKA (VdPKAC1) se vió reducida. Además, producían menos etileno, sugiriendo un papel importante del PKA en la síntesis de etileno. Estos mutantes mostraron un crecimiento similar al de la cepa silvestre, pero la germinación de las esporas fue ligeramente superior y la producción de conidios se redujo significativamente (Tzima *et al.* 2010).

La vía de señalización de las **proteínas G heterotriméricas** es una vía conservada en hongos filamentosos. Esta vía juega un papel importante en el control del crecimiento, el desarrollo, la virulencia y en el metabolismo secundario en hongos (Li *et al.* 2007). Las unidades básicas de esta vía son una proteína G acoplada a receptor y proteínas Gs (consistente en tres subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ ) (Figura 2).

**Figura 2.** Ciclo de la proteína G. El ligando se une al receptor de la proteína G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptor*) permite el cambio GDP a GTP en la proteína  $G\alpha$  y la disociación del dímero  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . Tanto  $G\alpha$ -GTP como  $G\beta\gamma$  pueden regular a los efectores. La hidrólisis de GTP por la subunidad  $G\alpha$  produce la reasociación de la unión  $G\alpha$ -GDP con el dímero  $G\beta\gamma$  y el receptor GPCR para completar el ciclo. El regulador de la señalización de la proteína G (RGS, del inglés *regulator of G protein signaling*) acelera la tasa de hidrólisis de GTP por las proteínas  $G\alpha$  (Li *et al.* 2007).

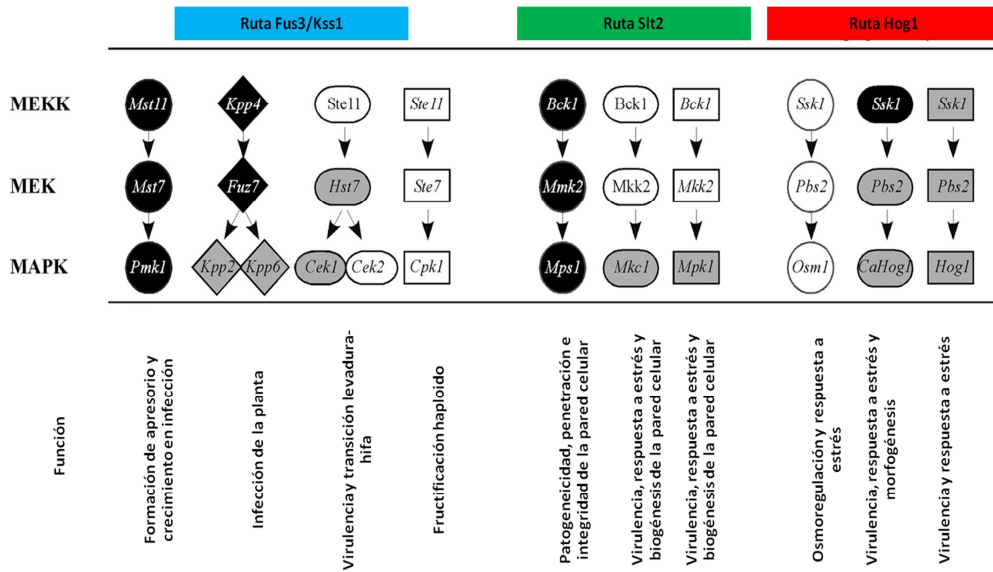


En hongos patógenos de plantas, tales como *Gibberella zeae* y *Fusarium oxysporum* algunas subunidades  $G\alpha$  regulan positivamente importantes mecanismos de señalización en el

crecimiento vegetativo del hongo y la patogénesis (Jain *et al.* 2002; Yu *et al.* 2008). En el hongo patógeno causante del chancro del castaño, *Cryphonectria parasitica*, la eliminación del gen *CPG-1*, que codifica la subunidad  $G\alpha$ , produce una reducción del crecimiento y la pigmentación, infertilidad, pérdida de virulencia y de esporulación asexual (Dawe y Nuss, 2001). Sin embargo, la eliminación del gen *CPG-2*, que codifica una segunda subunidad  $G\alpha$  en *C. parasitica*, solamente causa una pequeña reducción en el crecimiento y el desarrollo asexual; además, no tiene efecto en la patogenicidad (Dawe y Nuss, 2001), sugiriendo que estas subunidades  $G\alpha$  tienen diferentes funciones en *C. parasitica*. En *M. grisea*, hongo patógeno del arroz, se han identificado y caracterizado tres genes que codifican subunidades  $G\alpha$  (Liu y Dean, 1997) que son *MAGA*, *MAGB* y *MAGC*. Mutantes  $\Delta$ *MAGB*, gen ortólogo de *CPG-1* de *C. parasitica*, de *fadA* de *A. nidulans* y de *gna1* de *N. crassa* presentan una reducción significativa del crecimiento de la hifa, de la esporulación, de la formación de apresorios y de la patogenicidad. Contrariamente, la eliminación de los otros dos genes, *MAGA* y *MAGC*, no afecta al crecimiento y a la formación de los apresorios de los mutantes.

Los genes *FGB1* y *GBB1*, son genes que codifican la subunidad  $G\beta$  en *F. oxysporum* y *Gibberella moniliformis* respectivamente. Ambas proteínas sólo difieren en un aminoácido, sin embargo, su función en patogénesis es bastante diferente. Jain *et al.* (2003) demostraron que el gen *FGB1* está relacionado con la virulencia de *F. oxysporum*, mientras que *GBB1* en *G. moniliformis* no tiene impacto en la podredumbre del tallo del maíz (Sagaram y Shim, 2007).

En hongos filamentosos, como en otros organismos eucariotas, una familia de proteínas serín/treonin quinasas conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógeno (**MAP quinasas**) están involucradas en la transducción de una variedad de señales extracelulares y en la regulación de diferentes procesos del desarrollo. Estas señales extracelulares provienen del ambiente que las rodea, incluyendo las señales procedentes de la planta huésped (Figura 3). En hongos filamentosos esta vía está implicada en multitud de procesos, como el desarrollo y la virulencia, como ha quedado demostrado con la obtención de multitud de mutantes deficientes en algún componente de la vía (Zhao *et al.* 2007). En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado cinco rutas de transducción de señales en las que intervienen MAP quinasas (ruta de respuesta a feromonas, ruta del crecimiento filamentoso, ruta de alta osmolaridad/glicerol, ruta de la integridad de la pared celular y ruta del ensamblaje de la pared de la espora) (Chen y Thorner, 2007). Tres de las cinco rutas poseen su homólogo en hongos filamentosos: la ruta Fus3/Kss1 está relacionada con la reproducción sexual y el crecimiento filamentoso, la ruta Slit2 (Mpk1) está relacionada con la integridad de las células y la ruta Hog1 está relacionada con la respuesta a estrés (especialmente a la presión osmótica).



**Figura 3.** Ruta de las MAPK en hongos patógenos (Zhao *et al.* 2007). Componentes básicos de las tres rutas de señalización MAPK en cuatro hongos patógenos. Círculos para *Magnaporthe grisea*, cuadrados para *Ustilago maydis*, óvalos para *Candida albicans* y rectángulos para *Cryptococcus neoformans*.

En *S. cerevisiae*, la ruta de la MAPK en las que intervienen las proteínas quinasas Ste7, Ste11 y Fus3/Kss1, que forman parte de la ruta de respuesta a feromonas, se ha demostrado que es necesaria para la reproducción y el crecimiento filamentoso (Gustin *et al.* 1998). Varios genes homólogos de Fus3 y Kss1 en los hongos patógenos de plantas *M. grisea* (*PMK1*), *Colletotrichum lagenarium* (*CMK1*) y *Pyrenophora teres* (*CMK1*) *Botrytis cinerea* (*BMP1*) son esenciales para la formación del apresorio y la infección (revisión Zhao *et al.* 2007). En *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad del factor de transcripción Ste12 está controlada por la cascada Fus3/Kss1. En patógenos de plantas como *M. grisea*, dos *Colletotrichum sp.* y *Cryphonectria parasitica*, se han descubierto homólogos a Ste12 y se ha demostrado que son necesarios para la infección. Mutantes deficientes en Ste12 no son patógenos o presentan reducida enormemente la virulencia además de mostrar defectos en el proceso de penetración del huésped (Deng *et al.* 2007; Hoi *et al.* 2007). En *F. oxysporum*, estos mutantes presentaron deficiencias en el crecimiento invasivo tanto en tomate como en manzanas y también en la capacidad de penetración sobre membranas de celofán (Rispaill y Di Pietro, 2009). En el hongo necrótrofo *B. cinerea* que invade los tejidos blandos y los frutos maduros de una gran variedad de plantas, al igual que otros hongos, la proteína BMP1, que es homóloga a la MAPK Fus3/Kss1, es esencial para la patogénesis. El mutante  $\Delta bmp1$  posee deficiencias en la formación de las estructuras de los apresorios, resultando en un fenotipo no patógeno y son incapaces de germinar en superficies hidrofóbicas en ausencia de nutrientes (Doehleemann *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2000). En *Alternaria brassicicola*, mutantes de *amk1* no son patógenos en plantas intactas, pero aún pueden colonizar heridas de las hojas en presencia de suplementos nutricionales. Amk1 es esencial para la producción de conidios maduros y la regulación de varios genes de enzimas hidrolíticas (Cho *et al.* 2007).

La ruta de alta osmolaridad/glicerol interviene en las respuestas al choque hiperosmótico y otros tipos de estrés. Esta ruta en *S. cerevisiae* está controlada por *Hog1*. Homólogos a este gen han sido estudiados en diferentes hongos patógenos. En *A. fumigatus* han sido descritos dos homólogos de *Hog1*, *SakA* y *MpkC*, que juegan roles diferentes en la respuesta a estrés oxidativo y nutricional, pero no son requeridos para la virulencia (Reyes *et al.* 2006; Xue *et al.* 2004). Igualmente, mutantes deficientes en *Osm1*, homólogo de *Hog1* de *M. grisea* son sensibles al estrés osmótico, pero forman un apesorio funcional y son totalmente virulentos en plantas de arroz (Dixon *et al.* 1999). Mutantes en los que se eliminó el homólogo a *HOG1* en *C. parasitica*, *Bipolaris oryzae*, *C. lagenarium*, y *M. graminicola* son todos sensibles al estrés hiperosmótico (Park *et al.* 2004; Kojima *et al.* 2002; Mehrabi *et al.* 2006; Moriwaki *et al.* 2006). En muchos hongos filamentosos, incluyendo *N. crassa*, *C. lagenarium* y *M. grisea*, los mutantes en los que se bloqueó la ruta HOG son resistentes a fungicidas fenilpirroles, dicarboximidas e hidrocarburos aromáticos (Zhang *et al.* 2002; Motoyama *et al.* 2005). El tratamiento con estos fungicidas estimula la activación del homólogo de *Hog1*, la acumulación de glicerol e hinchazón celular, indicando que los efectos de los fungicidas pueden resultar en la sobreestimulación de la ruta de la osmoregulación.

La ruta *SlT2* (*Mpk1*) está relacionada con la integridad de las células y es responsable de orquestar los cambios en la pared celular a través del ciclo celular y en respuesta a diferentes formas de estrés (Levin, 2005). La caracterización funcional del homólogo de *SLT2* en diferentes hongos patógenos de plantas ha indicado que esta MAPK está bien conservada entre los hongos patógenos y juega un importante rol durante la infección de la planta (revisión Zhao *et al.* 2007). *Mps1* es esencial para la conidiación, penetración del apesorio e infección de la planta en *M. grisea* (revisión en, Liu y Winey, 2012). En *F. graminearum*, la falta de *Mgv1* produce una conidiación normal, pero la virulencia se ve claramente disminuida, la fertilidad está claramente afectada y aumenta la sensibilidad de la pared celular a las enzimas de degradación (Hou *et al.* 2002). Sin embargo, existe una excepción en *A. fumigatus*, en el que el homólogo *MpkA* controla la señalización de la pared celular y la respuesta al estrés oxidativo, pero es dispensable para la virulencia (Valiante *et al.* 2008).

La señalización por calcio es una ruta importante en eucariotas implicada en multitud de procesos celulares, incluyendo la alteración de la expresión de genes en respuesta a estímulos externos. Existen dos importantes mediadores de la señales de calcio en las células eucariotas como son la proteína de unión a calcio denominada calmodulina y la fosfatasa dependiente de calmodulina, que se denomina calcineurina (Kraus y Heitman, 2003). Las funciones de la calmodulina y calcineurina están muy conservadas entre los hongos filamentosos y juegan una importante función, como se demuestra que hay sólo unos pocos mutantes deletantes viables de calcineurina. Todos estos muestran un crecimiento vegetativo perturbado. Por ejemplo, la delección del gen *cna1* en *A. fumigatus* produce mutantes que tienen afectado el crecimiento, la morfología de las hifas, la esporulación y la patogenicidad (Ferreira *et al.* 2007). En hongos patógenos de plantas como *Sclerotinia sclerotiorum*, se ha demostrado que la calcineurina controla el desarrollo esclerotidial y la

infección (Harel *et al.* 2006) y que actúa como un factor de virulencia en *B. cinerea* (Schumacher *et al.* 2008).

#### **4.2 Genes implicados en el metabolismo de nutrientes esenciales**

Tras la penetración, los hongos necrótrofos patógenos de plantas causan la lisis celular y la muerte de las células huésped. Es de suponer que la lisis de las células huésped llevaría a un aumento de la accesibilidad de nutrientes, sin embargo, como se evidencia a partir del estudio de mutantes autótrofos, ciertos aminoácidos como la metionina y la histidina no se suministran en cantidades suficientes por el tejido del huésped y su biosíntesis es llevada a cabo por el hongo (Balhadere *et al.* 1999; Seong *et al.* 2005). La expresión coordinada de los genes relacionados con la adquisición de nutrientes durante la infección fue puesta de manifiesto en el análisis del transcriptoma de la infección por *Fusarium graminearum* (Güldener *et al.* 2006). A día 2 tras la infección se expresaba un transportador de ornitina, que es un importante intermediario de la ruta metabólica de la biosíntesis de arginina, prolina así como putrescina, que es un precursor de otras poliaminas y pirimidinas. La captación de ornitina fue seguida por la expresión de genes de biosíntesis de arginina, prolina y la putrescina a partir del día 3 y hasta el día 6 tras la infección. Otro ejemplo del modo de acción de los genes implicados en nutrición fue expuesto por Bailey (2000) en el que observó que mutantes auxótrofos de putrescina del hongo patógeno del trigo *Stagonospora nodorum* en los que se eliminó el gen que codifica una ornitina descarboxilasa, *odc1*, eran mucho menos virulentos en trigo.

Los hongos necesitan obtener nutrientes del huésped durante la invasión y por lo tanto no es sorprendente que se hayan identificado genes de virulencia relacionados con la nutrición. En muchos de los organismos examinados hasta ahora, mutaciones en genes de la vía del glioxalato, implicada en la oxidación de ácidos grasos, tales como una isocitrato liasa y una malato sintasa, conducen a una pérdida de patogenicidad (Dunn *et al.* 2009). Al igual que los ácidos grasos, los azúcares como la sacarosa son importantes en la nutrición de los hongos. Un transportador de alta afinidad de sacarosa (SRT1) de *U. maydis* permite la absorción de la sacarosa del apoplasto del maíz. Este gen se expresa sólo durante la infección y un mutante carente de este gen no es patogénico (Wahl *et al.* 2010).

Minerales, tales como el hierro, son esenciales para el crecimiento del hongo y su desarrollo. Los sideróforos son pequeños péptidos que son capaces de quelar el hierro y son utilizados por los hongos para adquirir el hierro presente en el medio. En cuatro hongos fitopatógenos (*Cochliobolus heterostrophus*, *C. miyabeanus*, *F. graminearum* y *Alternaria brassicicola*), la eliminación del gen que codifica una péptido sintasa no ribosomal involucrada en la síntesis de estos sideróforos, puede conducir a una reducción de la virulencia como resultado de la incapacidad del hongo para adquirir el hierro necesario *in planta* (Oide *et al.* 2006).

### **4.3 Enzimas degradadoras de pared celular**

Los hongos patógenos de plantas producen enzimas extracelulares que pueden degradar los componentes de la pared celular de las plantas. La degradación de los polímeros de la pared celular de la planta no sólo supone una importante fuente de nutrientes sino que también permite la penetración y la dispersión del hongo a través del tejido de la planta (Tonukari, 2003).

Las enzimas que degradan la pared celular y otras barreras físicas como la cutina pueden ser esenciales para la patogenicidad de los hongos filamentosos. Sin embargo, estas evidencias son difíciles de comprobar porque estas enzimas son codificadas normalmente por familias multigénicas (Walton, 1994). Un claro ejemplo puede encontrarse en la secuenciación del genoma de dos hongos fitopatógenos como *M. grisea* (Dean *et al.* 2005) y *F. graminearum* (Cuomo *et al.* 2007) que contienen 138 y 103 genes que codifican enzimas de degradación de la pared celular, respectivamente. En comparación, el genoma *U. maydis*, un hongo biotrofo patógeno de maíz, no está tan bien equipado con genes que codifican enzimas de degradación de la pared celular, conteniendo sólo 33 de tales enzimas hidrolíticas (Kämper *et al.* 2006). A la luz del gran número de familias génicas que codifican enzimas de degradación de pared celular que pueden realizar las mismas funciones o similares, es concebible que esa redundancia génica dificulte la obtención de un fenotipo claro y concluyente cuando se obtiene un mutante de delección de un único gen (Walton, 1994). Esta redundancia explica que en muchas ocasiones la eliminación de un determinado gen no tenga un efecto fenotípico claro debido a que la función de otros genes puede enmascarar su ausencia. El rol de estas enzimas en patogénesis de plantas es más complicado porque su actividad produce oligosacáridos que pueden inducir o suprimir las defensas del huésped (Moerschbacher *et al.* 1999). Sin embargo, no todas las enzimas de una determinada familia parecen contribuir por igual a la virulencia. Por ejemplo, se ha analizado el papel de las pectinasas de *B. cinerea* en detalle y se ha comprobado que al menos seis genes de endopoligalacturonasas poseían una expresión diferencial durante el proceso de infección, pero sólo dos de ellas fueron esenciales para la virulencia del hongo (Williamson *et al.* 2007).

La cutícula de las plantas terrestres es una estructura externa formada por varias capas de lípidos cuyo componente principal es la cutina, que asociada con ceras protege a la planta de la desecación a la que es expuesta en la atmósfera terrestre, además de proveer una barrera contra la entrada de bacterias y hongos. Es formada y secretada por las células de la epidermis (Pollard, 2008). Las cutinasas, son las enzimas encargadas de la degradación de la cutícula. Estas enzimas forman parte de familias multigénicas y pueden ser factores de patogenicidad en los hongos fitopatógenos que necesitan penetrar directamente la superficie del huésped. El rol de las cutinasas en los primeros estadios de la patogénesis de hongos ha sido ampliamente investigado. Sin embargo, las conclusiones siguen siendo controvertidas. En la mayoría de los casos en los que se han obtenido mutantes donde se han eliminado estos genes no se ha visto un efecto en el proceso de infección (Stahl y Schäfer, 1992; van Kan *et al.* 1997). En contados casos se han aportado evidencias genéticas de que las cutinasas podrían ser determinantes cruciales para la virulencia o la patogenicidad en la



penetración del huésped, como en estudios de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* donde la eliminación de un gen que codifica una cutinasa produjo mutantes no patogénicos (Rogers *et al.* 1994) o ejemplos similares descritos en *Pyrenopeziza brassicae* y *M. grisea* donde la eliminación de los genes *Pbc1* y *CUT2* respectivamente, que codifican dos cutinasas, también se vio reflejada en una reducción de la virulencia (Li *et al.* 2003; Skamnioti y Gurr 2007).

Dado que la pectina es uno de los componentes mayoritarios de la pared celular vegetal, el grupo de enzimas degradadoras de pared celular tradicionalmente más estudiada han sido las pectinasas. Estas proteínas se encargan de degradar las sustancias pécticas presentes en la lámina media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. La degradación de la pectina por enzimas tales como pectin liasas, pectato liasas, poligalacturonasas y pectin metilesterasas es un factor importante en la patogenicidad de algunos hongos. La eliminación del gen *pelB*, que codifica una pectato liasa, en *C. gloeosporioides*, resultó en mutantes en los que se produjo una reducción de la patogenicidad sobre aguacate (Yakoby *et al.* 2001). Sin embargo, la eliminación del gen *pnlA* que codifica una pectin liasa en *Glomerella cingulata* no afectó a la patogenicidad (Bowen *et al.* 1995). La eliminación individual de los genes *pelA* y *pelD* que codifican dos pectato liasas en *Fusarium solani* resultó en líneas mutantes que aún eran patogénicas, sin embargo, la eliminación simultánea de ambos genes sí que conllevó una reducción en la patogenicidad sobre guisantes (Rogers *et al.* 2000). En *F. solani* se han encontrado cuatro genes que codifican pectato liasas y aunque parece que sólo dos de las cuatro son esenciales para la patogenicidad Rogers y colaboradores proponen un modelo en el cual los cuatro genes están involucrados. Estos autores sugieren que la expresión constitutiva de *pelB* y *pelC* produce fragmentos de pectina cuando el hongo se posa sobre la planta. Estos fragmentos inducen la expresión de *pelA*, cuya proteína ayuda a la penetración de la planta, mientras que *pelD* se expresa *in planta*. La eliminación individual de los genes *Bcpg1* y *Bcpg2*, que codifican poligalacturonasas, en *B. cinerea* produce una reducción en el tamaño de las lesiones en las hojas de los frutos de tomate y de manzana (ten Have *et al.* 1998) y un retraso en la aparición de lesiones primarias en hojas de tomate (Kars *et al.* 2005), mientras que la eliminación individual de otros cuatro genes que codifican poligalacturonasas o de dos genes que codifican pectin metil esterases no tiene efecto apreciable (Williamson *et al.* 2007). En el hongo patógeno de frutos cítricos *A. citri* la eliminación de un gen que codifica una endopoligalacturonasa resultó en una reducción de los síntomas de la enfermedad en frutos cítricos, mientras que la eliminación de un gen homólogo en *A. alternata*, patógeno de frutos de limón, resultó en mutantes con una patogenicidad normal en hojas de cítricos (Isshiki *et al.* 2001). Todos estos resultados sugieren que la importancia de un gen en la patogenicidad o virulencia de un hongo puede depender en gran medida del mecanismo de infección que utilice.

Aparte de la pectina, la pared celular de las plantas también está formada por otros polisacáridos como son la celulosa y la hemicelulosa. La celulosa es el componente más abundante en la naturaleza y el mayor constituyente de la pared celular de las plantas otorgándoles su rigidez. La celulosa consiste en uniones  $\beta$ -1,4 de unidades de glucosa que forman una cadena lineal de 8000-12000 unidades de glucosa.

La hidrólisis completa de la celulosa a glucosa requiere de la acción combinada de múltiples enzimas con diferentes sustratos específicos. La celobiohidrolasa que elimina unidades de celobiosa del final de la cadena del polisacárido. La endoglucanasa corta internamente las cadenas celulosa (Teeri, 1997). Y finalmente  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa que sirve como una fuente de carbono fácilmente metabolizable por los hongos. En el hongo fitopatógeno *Pyrenochaeta lycopersici*, que infecta tomate, se aisló y caracterizó una endoglucanasa (PIEGL1) cuyos niveles de expresión se correlacionaron con el avance de la enfermedad (Valente *et al.* 2011). Moy y colaboradores (2004) demostraron también que un número de genes fúngicos entre los que se encontraba una endoglucanasa eran inducidos durante el proceso de infección de *Phytophthora sojae* en plantas de soja. Sin embargo, a pesar del presupuesto destacado papel que juegan este tipo de enzimas en la patogénesis de plantas, su importancia real todavía es bastante desconocida ya que la mayoría de los estudios existentes se centran en su papel como enzimas implicadas en varios procesos industriales. Entre estos procesos destaca la producción de etanol como fuel, procesamiento de almidón, industria textil y papelera etc... (Gao *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2008).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y tiene una composición heterogénea de varias unidades de azúcares (Scheller y Ulvskov, 2010). El xilano es el mayor componente de la hemicelulosa. Las enzimas encargadas de la degradación de la hemicelulosa son las hemicelulasas y entre ellas destacan las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas. Estas hemicelulasas están claramente involucradas en la degradación de la pared celular, lo que sugiere su importante papel en la patogénesis de los hongos fitopatógenos (Walton, 1994). En la infección de *B. cinerea* sobre tomate se ha detectado un gen (*xyn11A*) que codifica una endo- $\beta$ -1,4-xilanasas. Mutantes deficientes en este gen mostraron una disminución en su virulencia, obteniéndose una reducción del tamaño de la lesión de más del 70 % con respecto a la cepa silvestre (Brito *et al.* 2006). Este efecto en la reducción de la patogénesis de *B. cinerea* contrasta con los estudios realizados en otros hongos fitopatógenos. Hasta el momento, los experimentos realizados con mutantes de otro hongos en los que se han eliminado varios genes que codifican endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, como en *Magnaporthe grisea* (Wu *et al.* 1997), *Cochliobolus carbonum* (Apel *et al.* 1993; Apel-Birkhold y Walton 1996) y *F. oxysporum* (Gomez-Gomez *et al.* 2002) muestran que la virulencia no se vió afectada.

#### **4.4 Efectores**

En las últimas décadas los efectores han sido cada vez más estudiados en las interacciones planta-patógeno (Hogenhout *et al.* 2009). Una vez que el sistema basal de defensa de las plantas ha sido sobrepasado por los patógenos, la percepción de efectores por proteínas R de la planta produce la activación de la ETI, que conlleva una respuesta de defensa en las plantas. En la actualidad, la definición comúnmente adoptada para estos efectores es la dada por Sophien Kamoun, que los definió como moléculas que manipulan la estructura y la función de la célula huésped, lo que facilita la infección (factores de virulencia o toxinas) y/o desencadenar las respuestas de defensa (factores de avirulencia o elicitores) (Kamoun, 2006). Las plantas y sus patógenos han coevolucionado durante millones de años, lo que ha dado lugar a la evolución de algunos genes de resistencia en las plantas para prevenir o

limitar la infección por patógenos, y al mismo tiempo algunas proteínas efectoras de los patógenos también han evolucionado para superar la defensa de la planta, mediante la mutación de los efectores o el desarrollo de nuevos efectores que podían evitar o suprimir la ETI (Chisholm *et al.* 2006; Jones and Dangl, 2006; Kamoun, 2006).

Muchos hongos fitopatógenos producen efectores proteicos (algunos también se conocen como toxinas selectivas de huésped) que promueven la enfermedad. En *Cladosporium fulvum* se han clonado cuatro genes *Avr* que codifican pequeñas proteínas ricas en cisteínas que son secretadas durante la infección, incluyendo *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* y *Avr9*, que son reconocidas en tomate por las proteínas *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E* y *Cf-9*, respectivamente (Joosten y De Wit, 1999; Thomma *et al.* 2005). El efector *Avr4* contiene un dominio funcional de unión a la quitina que protege a los hongos con quitina de las quitinasas vegetales, incluyendo *C. fulvum* (van den Burg *et al.* 2006; van Esse *et al.* 2007). En los genotipos de tomate que contienen la proteína *Cf-4*, *Avr4* induce una respuesta hipersensible; sin embargo, en las plantas que no tienen esta proteína de resistencia, *Avr4* es incapaz de inducir la RH, aunque son aún capaces de unir quitina (van den Burg *et al.* 2003; Joosten *et al.* 1997; Stergiopoulos *et al.* 2007). En *F. oxysporum f. sp. lycopersici* se conocen los efectores *Six* (porque son secretados en el xilema), que son producidos durante la infección de tomate. *Six1* (renombrado *Avr3*) es requerido para la virulencia en tomate (Rep *et al.* 2004, 2005), pero también activa la inmunidad mediada por efector (ETI) en presencia del producto del gen de resistencia del tomate *I-3* (Huang y Lindhout, 1997; Rep *et al.* 2004). Además, *Six3* (renombrado *Avr2*) contribuye a la virulencia pero también activa la ETI en presencia del producto del gen de resistencia *I-2* (Houterman *et al.* 2009). *Avr3* reside en un pequeño cromosoma que contiene más genes efectores, incluyendo *Six2* y *Six3*. Este cromosoma no se encuentra fuera del linaje de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* ni en otras especies patógenas de *Fusarium*, lo que sugiere que confiere virulencia específicamente en tomate. Además, estos datos sugieren que la capacidad de causar la enfermedad probablemente ha surgido durante la evolución de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* por la adquisición o la aparición de la región genómica que alberga los genes efectores necesarios para la infección de tomate. (van der Does *et al.* 2008). *Six4* (renombrado *Avr1*) confiere avirulencia de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* a las cepas de tomate que llevan el gen de resistencia *I-1*. Sin embargo *Avr1* no es requerido para la virulencia de las líneas de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* en plantas de tomate que no poseen el gen de resistencia *I-1*. Esto sugiere que *Avr1* ha evolucionado como un efector que suprime la ETI en lugar de PTI (Houterman *et al.* 2008).

Para algunos efectores de hongos patógenos no se ha establecido una relación gen por gen, como en el caso del hongo *Ustilago maydis*, donde se ha analizado la función de varios genes efectores en virulencia (Kahmann y Kamper, 2004). *Pep 1*, es una nueva proteína efectora de *U. maydis* que es esencial durante la penetración. *Pep1* se secreta en el apoplasto y se acumula en los sitios de paso entre célula y célula. La disrupción de *pep1* produce mutantes en los que no se ve afectado el crecimiento y tienen un desarrollo normal de las estructuras de infección pero son incapaces de penetrar la epidermis de las células y de elicitar una fuerte defensa de respuesta en la planta (Doehlemann *et al.* 2009).

Los hongos necrótrofos donde se encuadra *P. digitatum* obtienen sus nutrientes de las células muertas de sus huéspedes, sin embargo, los hongos biótrofos u obligados los obtienen de las células vivas. Como patógenos necrotróficos producen efectores proteícos (algunos también se conoce como toxinas selectivas de huésped) que promueven la enfermedad, y el huésped produce receptores que son requeridos para la susceptibilidad. Estos sistemas son a menudo considerados como una imagen espejular de los sistemas clásicos gen-por-gen que se encuentran en los patosistemas de los biótrofos, donde la relación entre los receptores del anfitrión y los productos de los genes de los patógenos desencadenan las respuestas de resistencia (Friesen *et al.* 2008).

*Stagonospora nodorum* y *Pyrenophora tritici-repentis* son dos hongos necrótrofos que producen varios péptidos específicos de huésped que son reconocidos por los genes de susceptibilidad del huésped para causar la enfermedad. SnTox1 fue el primer péptido tóxico descubierto producido por *S. nodorum* que interactúa con el correspondiente gen de susceptibilidad del huésped *Snn1* (Friesen *et al.* 2007). SnToxA es codificada por un gen con alto grado de similaridad al gen *ToxA* de *P. tritici-repentis* que tiene en el trigo el gen de susceptibilidad *Tsn1*. Mutantes en los que se eliminó el gen *Tsn1* no fueron sensibles ni a ToxA ni SnToxA, sugiriendo que ambas toxinas son funcionalmente similares ya que son reconocidos por el mismo locus del huésped (Liu *et al.* 2006).

Al igual que los efectores de los hongos patógenos biótrofos, los péptidos tóxicos de los patógenos necrótrofos representan los efectores que interactúan con las dianas de los huéspedes. Sin embargo, muchos de los efectores de los patógenos necrótrofos producen necrosis, facilitando la enfermedad, y por lo tanto podrían ser considerados como efectores básicos para los que la resistencia basada en la hipótesis gen por gen se ha desarrollado como un resultado de un bajo nivel de co-evolución. Podría ser que las dianas de los efectores de los patógenos necrótrofos y biótrofos sean intrínsecamente similares, pero que las de los agentes patógenos biótrofos han evolucionado aún más como resultado de la co-evolución y ya no inducen la necrosis, sino que manipulan a los huéspedes de forma menos agresiva.

Además, existen pequeñas proteínas que juegan un importante papel en las infecciones. Las secuencias de los genomas de varios hongos fitopatógenos están disponibles y los datos han revelado cientos de genes que codifican pequeñas proteínas secretadas. Muchos efectores fúngicos son pequeñas proteínas secretadas ricas en puentes disulfuro. En la mayoría de los casos estas proteínas parecen ser específicas para las especies de hongos o subgrupos, y la gran mayoría de ellas aún no han sido funcionalmente caracterizadas. Entre las pocas excepciones están las proteínas que actúan como inactivadores de fitoalexinas (Kikot *et al.* 2009), inhibidoras de enzimas hidrolíticas de plantas (Rooney *et al.* 2005), enzimas hidrolíticas (Kikot *et al.* 2009) y particularmente en hongos necrótrofos, como toxinas que inducen clorosis y necrosis en el huésped (Howlett, 2006; Möbius y Hertweck, 2009).

#### **4.5 Producción y detoxificación de toxinas**

Los hongos patógenos producen una amplia variedad de moléculas de bajo peso molecular que a menudo afectan a las actividades fisiológicas. A pesar de los varios miles de metabolitos producidos por los hongos que se han descrito, sólo una pequeña fracción de ellos ha sido objeto de un análisis más detallado, y sólo para una pequeña fracción de ellos se conoce la función biológica. Se conocen varios metabolitos secundarios fitotóxicos que tienen un efecto en la infección de los hongos, que también podríamos denominar toxinas. La patogenicidad de *Cochliobolus victoriae* sobre los cultivos de avena depende de la secreción de una toxina selectiva de huésped (HST) denominada victorina (Wolpert *et al.* 1985). Aislados de *C. victoriae* que son incapaces de producir victorina no son patogénicos (Scheffer *et al.* 1965). La toxina se une con alta afinidad a dos proteínas que pertenecen al complejo glicina descarboxilasa de la mitocondria, esto produce el colapso en el potencial de membrana mitocondrial e induce una respuesta de muerte celular similar a la apoptosis (Navarre y Wolpert, 1995; Curtis y Wolpert, 2004). Otra toxina selectiva de huésped es la toxina HC, un tetrapéptido producido por el ascomiceto *Cochliobolus carbonum* que es un determinante específico de virulencia en la interacción entre el hongo y su huésped, maíz. Un aislado deficiente en la toxina HC de *C. carbonum* produce una pequeña lesión en plantas susceptibles de maíz comparado con la cepa silvestre (Ahn y Walton, 1996). Las eniatinas son hexapéptidos cíclicos con propiedad fitotóxica producidas por varias especies de *Fusarium* y promueven la virulencia en los hongos. La eliminación del gen que sintetiza la eniatina en *Fusarium avenaceum* produce aislados que son defectivos en la biosíntesis de esta toxina y son menos efectivos en la colonización de tubérculos de patata que la cepa silvestre (Herrmann, 1996). La tentoxina es una fitotoxina no selectiva de huésped producida por hongos de las especies de *Aternaria*. Esta toxina bloquea la hidrólisis de ATP en ciertas ATPasas de los cloroplastos de las plantas produciendo una ruptura completa de la vía de obtención de energía en las células de las plantas causando clorosis. El estrés que se produce en la planta con la clorosis y la supresión de los mecanismos de resistencia, conlleva un aumento de la virulencia del patógeno. (Meiss *et al.* 2008). Otras toxinas de hongos son metabolitos secundarios, algunos de ellos son importantes en la enfermedad. El paso inicial en la biosíntesis de estas moléculas involucra péptido sintasas no ribosomales y poliquétido sintasas. Estas enzimas generalmente requieren de la activación por una fosfopantitenil transferasa (PPT1). Mutantes de este gen en *Colletotrichum graminicola* tienen un contenido muy reducido de metabolitos secundarios, incluyendo la melanina, forman muy pocos apresorios y son hipersensibles a las especies reactivas de oxígeno. Estos mutantes son incapaces de penetrar en el maíz, aunque pueden colonizar las heridas de las plantas, pero son deficientes en conidiación y no causan síntomas necróticos típicos de la antracnosis (Horbach *et al.* 2009). Los autores concluyeron que los metabolitos secundarios de los que carecen estos mutantes *PTT1* pueden ser necesarios para el estilo de vida del hongo necrotrófico. La mayoría de estos metabolitos secundarios que actúan como toxinas son importantes factores de virulencia. En algunos casos la toxina aislada por sí sola puede producir síntomas similares a la infección por el hongo. Es de destacar que algunas de las toxinas de hongos son capaces de activar las respuestas de defensa vegetal (Qutob *et al.* 2006). Sin embargo, no está claro aún si estos resultados son producidos por el

reconocimiento de estas toxinas por proteínas PRRs específicas de la planta o sólo es una consecuencia indirecta de la intoxicación de las células vegetales.

#### **4.6 Especies reactivas de oxígeno**

El desarrollo de los hongos se produce en íntimo contacto con el ambiente que les rodea, por lo tanto, están sometidos constantemente a factores de estrés tanto físicos como químicos. Todos los organismos con un estilo de vida aeróbico producen **especies reactivas de oxígeno (ROS)**. La producción de ROS por parte de la planta durante las primeras horas después de la inoculación del patógeno se conoce como explosión oxidativa y está causada principalmente por el superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Apel y Hirt 2004). Durante las interacción planta-patógeno, la producción de  $H_2O_2$  por una NADPH oxidasa específica de la membrana plasmática de plantas conlleva normalmente asociado la activación de lo que se denomina como reacción de hipersensibilidad (RH), que es un programa de muerte celular y defensa celular contra el ataque de los patógenos (Mur *et al.* 2008). Aunque ambos procesos normalmente ocurren conjuntamente, pueden ocurrir de forma independiente. Las ROS sirven como mensajeros secundarios en la vía de transducción de señales de respuesta ante patógeno (Neill *et al.* 2002; Veal *et al.* 2007). La reacción de hipersensibilidad juega un papel importante en la defensa de las plantas frente a microorganismos saprófitos y fitopatógenos biótrofos; sin embargo, es menos efectiva frente a fitopatógenos necrótrofos ya que la principal faceta de la RH es la formación de zonas necróticas justo en el sitio de la invasión, limitando los nutrientes al patógeno evitando así la invasión de otros tejidos sanos (Glazebrook, 2005). La mayoría de los hongos necrótrofos producen toxinas o enzimas de degradación de la pared celular que matan a las células del huésped antes de la invasión y así poder obtener nutrientes exclusivamente de tejidos muertos (Divon y Fluhr 2007). En la actualidad, la hipótesis más aceptada es que la respuesta hipersensible favorece el ataque de los patógenos necrótrofos. Por ejemplo, en *B. cinerea*, hongo filamentoso necrótrofo, la formación de ROS en planta está directamente correlacionada con la agresividad del mismo (von Tiedemann, 1997). Existen evidencias de que *B. cinerea* puede incluso requerir la respuesta hipersensible de su planta huésped para conseguir una patogenicidad completa (Govrin y Levine, 2000). Por lo tanto, *B. cinerea* produce  $H_2O_2$  tanto en cultivos axénicos como *in planta*, indicando que el hongo contribuye al aumento de la formación de ROS por la planta, permitiendo la muerte del tejido de la planta y con ello facilitando el crecimiento del hongo. Análisis citoquímicos han mostrado la presencia de  $O_2^-$  en las puntas de las hifas y la generación de  $H_2O_2$  en y alrededor de la pared celular del huésped que ha sido penetrado (Tenberge *et al.* 2002). Hay pruebas más claras de la evidencia de ROS y de la aparición de un estrés oxidativo en los tejidos atacados por *B. cinerea* (Lyon *et al.* 2004). Por lo tanto, la presencia de NADPH oxidasas en hongos filamentosos es de gran importancia. Las NADPH oxidasas son claves en las reacciones de defensa contra patógenos en los eucariotas superiores. Además, en hongos filamentosos las NADPH oxidasas están relacionadas con una amplia variedad de funciones, incluyendo la reproducción sexual, la formación de estructuras de penetración y el establecimiento de interacciones mutualistas (Egan *et al.* 2007; Lara-Ortiz *et al.* 2003; Malagnac *et al.* 2004). Se ha postulado que, en los hongos, la existencia de NADPH oxidasas está vinculada a un estilo de vida multicelular. Mientras que las levaduras

unicelulares no poseen genes *nox*, el número de genes *nox* aumenta de uno en *Aspergillus nidulans* a dos en *Podospora anserina* y al menos tres en *M. grisea* (Aguirre *et al.* 2005; Takemoto *et al.* 2007). Además, son consideradas enzimas claves en la producción de ROS y por lo tanto de jugar un papel importante en la virulencia de *B. cinerea* mediante la generación de  $O_2^-$ . Una posible fuente para este  $O_2^-$  podría ser una NADPH oxidasa. Segmüller y colaboradores (2008) analizaron mutantes simples y dobles de dos genes que codifican oxidasas NADPH (*bcnoxA* y *bcnoxB*) de *B. cinerea* y mostraron que ambos estaban involucrados en la formación de esclerocios. Además ambos genes tuvieron un gran impacto en la patogénesis, donde los mutantes de *bcnoxB* mostraron un retraso en la formación de lesiones primarias, probablemente debido a que las estructuras de penetración estaban dañadas. Los mutantes de *bcnoxA* eran capaces de penetrar el tejido del huésped del mismo modo que la de cepa silvestre, pero eran mucho más lentos en la colonización del tejido del huésped. Los mutantes dobles mostraron un efecto añadido: eran aberrantes en la penetración y colonización de los tejidos vegetales y, por tanto, casi no patógenos. En *S. sclerotiorum* se han identificado también dos NADPH oxidasas (*SsNox1* y *SsNox2*), las cuales están presumiblemente relacionadas con la generación de ROS. El silenciamiento de la expresión de *SsNox1* mediante RNA interferente demostró el papel central de esta enzima en la virulencia y la patogénesis, mientras que la inactivación del gen *SsNox2* resultó en el desarrollo limitado de los esclerocios, pero el organismo se mantuvo totalmente patógeno. Cepas  $\Delta Ssnox1$  tenían los niveles de ROS reducidos y fueron incapaces de desarrollar esclerocios, y de forma inesperada se correlacionó con una reducción significativa de la producción de oxalato. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones anteriores que indican que las NADPH oxidasas se requieren para el desarrollo de la patogénesis en hongos necrótrofos y son coherentes con la importancia de la regulación de ROS en el éxito de la patogénesis de *S. sclerotiorum* (Kim *et al.* 2011). Giesbert y colaboradores (2008) mostraron que la eliminación del gen *cpnox1* que codifica otra NADPH oxidasa en *C. purpurea* tenía impacto sobre la germinación de conidios y la patogenicidad. Estos mutantes eran capaces de penetrar la epidermis del huésped pero su capacidad para la colonización del tejido de la planta se vió altamente afectada.

Además, la sensibilidad relativa de los hongos patógenos a las ROS puede depender de la efectividad de su maquinaria de detoxificación. Para el desarrollo a través del ambiente oxidativo de los tejidos necróticos, los patógenos fúngicos han evolucionado múltiples sistemas de defensa, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Cessna *et al.* 2000; Mayer *et al.* 2001; Moye-Rowley 2003). Los sistemas enzimáticos especializados que producen los hongos fitopatógenos para contrarrestar las ROS están especializados en la neutralización del dióxígeno tóxico. En especial se ha estudiado la respuesta antioxidante producida por la enzima catalasa en algunos organismos fitopatógenos y también su relación con la virulencia. En el hongo patógeno del maíz *Cochliobolus heterostrophus* se han descrito tres catalasas monofuncionales codificadas por los genes *cat-1*, *cat-2* y *cat-3*. Con la finalidad de determinar la sensibilidad al  $H_2O_2$  y su implicación en virulencia se analizaron mutantes simples, dobles y triples de las tres catalasas. Todos los mutantes deficientes en *cat-3* presentan una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno en comparación con la cepa silvestre o con mutantes deficientes en *cat-1*, *cat-2* o ambas. Por lo tanto, *Cat-3* protege al

hongo del estrés oxidativo durante el crecimiento vegetativo. Pero ninguna catalasa es esencial para la virulencia del hongo (Robbertse *et al.* 2003). Otro caso en el que se ha estudiado la función de una catalasa ha sido en *C. gloeosporioides*, hongo causante de la antracnosis. El proceso de infección de este hongo presenta dos fases, una biotrófica donde los niveles del gen de la catalasa son muy bajos comparados con la otra fase que es necrotrófica. Estos cambios en la expresión del gen pueden estar asociados al desarrollo, al incremento del estrés oxidativo por la rápida degeneración de las células vegetales en la fase necrotrófica o por la deficiencia de nutrientes durante la última fase (Goodwin *et al.* 2001). En *Blumeria graminis*, hongo patógeno de la cebada, la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por una catalasa limita el efecto negativo de este oxidante en la invasión del patógeno y es importante en la relación huésped-patógeno (Soanes *et al.* 2002). Skamnioti y colaboradores (2007) al examinar la expresión de varios genes candidatos como antioxidantes en respuesta a la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de *M. grisea* observaron que la mayor expresión se correlacionaba con el gen *catB*, que codifica una catalasa. Los mutantes deficientes en el mismo mostraron una esporulación más pobre, conidios y apresorios más frágiles así como defectos en la melanización. Además, la virulencia sobre arroz de los mutantes  $\Delta catB$  se vio disminuida en relación a la producida por la cepa silvestre y también su capacidad de infección se redujo ante la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En *M. grisea* se obtuvo la secuencia de una catalasa purificada de un cultivo filtrado. Esto permitió identificar el gen que la codificaba como un gen catalasa-peroxidasa, *CPXB*. Los niveles de catalasa en el medio se redujeron drásticamente en mutantes en los que se eliminó el gen. Además, en comparación a la cepa silvestre, aumentó su sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido exógenamente. Los resultados de este estudio sugieren que este gen juega un papel importante en la defensa del hongo contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado en las células de la epidermis del arroz en los primeros estadios de la infección pero no en la patogénesis de *M. grisea* (Tanabe *et al.* 2011). En *B. cinerea*, la eliminación del gen *Bccat2*, que codifica una catalasa, no tiene efecto en la virulencia del hongo (Schouten *et al.* 2002). Del mismo modo, en el hongo biotrófo *Claviceps purpurea*, la eliminación de los genes que codifican una catalasa y una superóxido dismutasa (SOD) extracelular no tuvo efecto en la virulencia sobre centeno (Garre *et al.* 1998; Moore *et al.* 2002). Sin embargo, la inactivación del factor de transcripción CPTF1, que controla todos los genes de catalasas del hongo, sí que tiene una influencia significativa en la virulencia (Nathues *et al.* 2004). Otro importante mecanismo que utilizan los hongos para eliminar las ROS producidas por la planta es la SOD. La superóxido dismutasa es una enzima que transforma el superóxido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es menos tóxico, pero es más estable y capaz de difundir fácilmente a través de las membranas (Branco *et al.* 2004). Rolke y colaboradores (2004) realizaron un análisis funcional de mutantes de *B. cinerea* carentes de dos genes que codifican una glucosa oxidasa (*bcgod1*) y una superóxido dismutasa (*bcsod1*) y mostraron que la GOD no contribuye significativamente a la generación de ROS (y virulencia), mientras que deletantes del gen *bcsod1*, que codifica una SOD Cn/Zn, conlleva una reducción significativa de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* y una reducción del tamaño de la lesión en plantas de judía.



#### **4.7 Implicación del pH en patogénesis**

La secreción de **ácido oxálico (AO)** es ubicua en la naturaleza y juega diversos roles en varios organismos, incluyendo animales, plantas y hongos (revisión Dutton y Evans, 1996). El papel de la secreción de AO en la patogénesis de hongos filamentosos ha sido ampliamente estudiado en el hongo modelo *S. sclerotiorum* (Godoy *et al.* 1990; Kim *et al.* 2008; Walz *et al.* 2008). El AO es una molécula multifuncional que contribuye a multitud de procesos fisiológicos (por ejemplo reducción del pH, activación de enzimas inducidas por acidificación, elevación de los niveles de calcio, guardián de la regulación celular, conexión vascular con cristales de oxalato) que contribuyen a la colonización de las plantas huésped por parte de los hongos (revisión Dutton y Evans, 1996).

Adicionalmente, estudios realizados con mutantes deficientes en la producción de AO sugieren sin lugar a dudas que el AO es un determinante de patogenicidad esencial y un factor clave en un amplio número de sucesos patogénicos de este hongo (Bolton *et al.* 2006; Cessna *et al.* 2000). Mutantes de *S. sclerotiorum* deficientes en la producción de AO fueron incapaces de infectar plantas de *Arabidopsis* (Dickman y Mitra, 1992) y la deficiencia pudo ser restituida añadiendo AO. Más evidencias de la importancia del AO en la patogenicidad se demostraron por el hecho de que mutantes defectivos de AO de *S. sclerotiorum* eran incapaces de iniciar la infección a pesar de la producción de los mismos niveles o incluso superiores de enzimas de degradación de pared celular (Dutton *et al.* 1996). En los últimos años se ha demostrado que el AO es un efector fúngico que induce la muerte celular en el tejido de la planta huésped produciendo apoptosis como marca característica. El AO además facilita la patogenicidad de *S. sclerotiorum* de forma indirecta actuando como molécula de señalización a través de la manipulación de las ROS del huésped (Kim *et al.* 2008). Además de facilitar la infección, el AO parece que entra en el torrente vascular, provocando el marchitamiento de las hojas (Jennings *et al.* 1998).

Recientemente se han presentado evidencias de que este potente necrótrofo modula el programa de muerte celular del huésped a través de la secreción de AO, por un mecanismo independiente de la acidificación. Sorprendentemente, este proceso se inicia por una reducción del ambiente generado por el hongo en las células del huésped. Como una consecuencia directa de esta manipulación del potencial redox, el hongo evita las respuestas de defensa del huésped, inhibe la explosión oxidativa y prepara el establecimiento de la enfermedad. Además, mutantes AO<sup>-</sup>, los cuales no son patogénicos, son incapaces de suprimir las defensas de la planta resultando en una activación del reconocimiento del hongo por la planta que está acompañado por muerte celular delimitando la zona de infección así como la formación de callosa, sugiriendo una respuesta similar a la RH (Williams *et al.* 2011). El oxalato, éster del AO, como se ha comentado anteriormente, produce una acidificación del medio y determina el pH ambiental de las inmediaciones del micelio que produce la infección. Una característica frecuente en la interacción fruto-patógeno es la modificación del pH del huésped a través de la producción por parte del patógeno de ácidos o bases, como por ejemplo ácido oxálico, ácido cítrico o amonio. Prusky y Yacoby (2003) han proporcionado una visión interesante sobre el papel del pH del huésped en el proceso de patogenicidad de

hongos fitopatógenos y la manipulación del pH por medio de los mismos. El patógeno puede alterar de forma dinámica el pH local para adaptarse a su arsenal enzimático, por lo que su patogenicidad se relaciona con la capacidad o eficiencia para poder variar el pH. El efecto de la variación del pH estará relacionado con la capacidad de la planta de poder amortiguarlo y por lo tanto un patógeno tendrá diferentes efectos en diferentes huéspedes. La habilidad de los patógenos para alterar el pH ha sido descrita en el pasado para una gran cantidad de patógenos tales como *Colletotrichum sp.*, *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum* (Eshel *et al.* 2002a, b; Manteau *et al.* 2003; Prusky *et al.* 2001, 2004; Rollins y Dickman, 2001). Según la capacidad de los patógenos de variar el pH podemos diferenciarlos en alcalinizadores y acidificadores algunos de los cuales se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Efecto del ataque de los hongos en la modulación del pH del huésped por diferentes patógenos (Prusky y Yakoby, 2003).

<b>Hongos alcalizadores</b>	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	aguacate
<i>C. acutatum</i>	manzana, fresas
<i>C. coccodes</i>	tomate
<i>Alternaria alternata</i>	melon, tomate, pimiento
<b>Hongos acidificadores</b>	
<i>Penicillium digitatum</i>	cítricos
<i>P. italicum</i>	cítricos
<i>P. expansum</i>	manzana
<i>B. cinerea</i>	tomate, manzana, pimiento
<i>Geotrichum candidum</i>	cítricos
<i>S. sclerotiorum</i>	Amplio rango de huéspedes

La alcalinización ambiental por parte de los hongos se consigue mediante la secreción activa de amonio. La producción de amonio por los hongos parece ser un resultado de la activación de una actividad proteasa seguida por una desaminación de los aminoácidos, lo que conduce a la producción de amonio con la consiguiente alcalinización ambiental (Jennings, 1989). Un ejemplo ampliamente estudiado es el hongo *C. gloeosporioides*, que es un hongo patógeno de plantas con un amplio rango de huéspedes que alcaliniza el pH del tejido del huésped durante el desarrollo de la enfermedad (Prusky *et al.* 2001). La alcalinización del huésped involucra la secreción activa de amonio inducida por el bajo pH del huésped, como se detectó en el tejido de varios frutos infectados por *Colletotrichum* (Alkan *et al.* 2008; Diéguez-Uribeondo *et al.* 2008; Prusky y Yakoby 2003). Por ejemplo, en el mesocarpo del aguacate, se detectó un incremento del pH de 5,6 en fruta sana a 8,5 en frutos colonizados por *C. gloeosporioides*, mientras que la acumulación de amonio aumentó en casi un 500 % (Prusky *et al.* 2001; Yakoby *et al.* 2000). Cepas de *Colletotrichum* que mostraban una reducción de la secreción de amonio, tales como mutantes *nit<sup>-</sup>* y *ΔareA*, mostraron una significativa reducción de la virulencia (Alkan *et al.* 2008), un hallazgo consistente con la participación de la acumulación de amonio durante la colonización del hongo. Del mismo modo, con otros hongos del mismo género, *C. acutatum* y *C. coccodes*, se detectó un

aumento del pH y una mayor acumulación de amonio durante la colonización de sus huéspedes (Prusky *et al.* 2001). La secreción de amonio también ha sido demostrada en otros hongos como *A. fumigatus*, *Candida albicans* y *Metarhizium anisopliae* (De Bernardis *et al.* 1998; St Leger *et al.* 1999; Willger *et al.* 2009). A este tipo de hongos se les considera alcalinizadores. En el lado opuesto se sitúan aquellos que siguen una estrategia totalmente opuesta, acidificando el pH del tejido del huésped, por tal hecho se les denominan acidificadores. Bateman y Beer (1965) fueron los primeros en sugerir la estrecha relación entre el pH y la patogenicidad. Afirmaron que la acidificación de los tejidos durante el ataque de patógenos se realiza con la finalidad de ajustar el pH del apoplasto a valores que podrían ser más adecuados para la degradación enzimática de las paredes celulares de plantas. Otros hongos patógenos como *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea* (Prusky *et al.* 2004) y *S. sclerotiorum* (Bateman y Beer, 1965; Rollins y Dickman, 2001; Vautard-Mey y Fevre, 2003) utilizan la acidificación del tejido en su ataque. La acidificación del tejido aumenta por la acumulación de ácidos orgánicos y la excreción de H<sup>+</sup>. *S. sclerotium* y *Botrytis* disminuyen el pH del huésped mediante la secreción de altas cantidades de ácido oxálico (Manteau *et al.* 2003; Rollins y Dickman, 2001; Billon-Grand *et al.* 2012), mientras que el ácido cítrico y glucónico son principalmente secretados por *Penicillium* (Prusky *et al.* 2003). En el caso de *P. expansum*, el ácido glucónico es producido como el principal ácido orgánico. Los ácidos orgánicos son secretados durante la infección, y crean un ambiente ácido necesario para la actividad de las poligalacturonasas producidas por estos hongos (Magro *et al.* 1984; Prusky y Yakoby, 2003; Hadas *et al.* 2007). En conjunto, estos resultados sugieren que el pH del medio ambiente es importante como un regulador global para la mejora de la virulencia de varios patógenos potscosecha.

La expresión génica en respuesta al pH ambiental en hongos filamentosos está controlada por un factor de transcripción con tres dedos de cinc denominado PacC. PacC se activa a pH alcalino mediante proteólisis de la proteína precursora, para convertirse en la forma activa capaz de entrar en el núcleo donde activa la expresión de genes "alcalinos" y reprime la de genes "ácidos" (Peñalva y Arst, 2002). El factor de transcripción PacC regula la expresión de genes que codifican enzimas extracelulares tales como xilanasas (MacCabe *et al.* 1998), antibióticos y producción de toxinas (Keller *et al.* 1997), permeasas (Vankuyk *et al.* 2004) y sideróforos (Eisendle *et al.* 2004), así como de otros genes involucrados en los procesos de patogenicidad (Caracuel *et al.* 2003; Rollins, 2003; Bignell *et al.* 2005).

Un gran número de investigaciones documentan la relación entre el pH de la planta huésped y la virulencia del hongo pero no abordan de manera experimental la participación de PacC en la regulación mediada por pH (Cotton *et al.* 2003; Prusky *et al.* 2001; Prusky *et al.* 2004). Para estudiar el papel del pH en la patogenicidad de *F. oxysporum*, se clonó el gen *pacC* y se obtuvieron dos tipos de mutantes: los mutantes portadores de un alelo nulo *pacC<sup>+/−</sup>*, por interrupción de su fase codificante, mostraron un fenotipo de mimetizaba el crecimiento en medio ácido. Un segundo tipo de mutantes son los portadores de un alelo truncado que determina una proteína PacC constitutivamente activa. Estos mutantes *pacC<sup>C</sup>* mimetizan el crecimiento en condiciones de alcalinidad independientemente del pH ambiental (Caracuel *et al.* 2003a, Caracuel *et al.* 2003b). Los mutantes *pacC<sup>C</sup>* muestran un fenotipo caracterizado

por el escaso crecimiento a pH ácido, producción reducida de fosfatasas y proteasas ácidas, aumento de producción de proteasas alcalinas, mayor resistencia al agua oxigenada y a cationes tóxicos. Sin embargo, los mutantes *pacC*<sup>+/-</sup>, con pérdida de función, presentan un escaso crecimiento a pH alcalino y una mayor producción de fosfatasas y proteasas ácidas, como corresponde a su fenotipo de mimesis de acidez y una mayor sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno y a cationes tóxicos. Respecto a la capacidad de infección, el mutante *pacC*<sup>+/-</sup> era más virulento que la cepa silvestre, mientras que el mutante *pacC*<sup>C</sup> mostró un claro retraso en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Caracuel *et al.* 2003). Rollins (2003) creó mutantes de *S. sclerotiorum* en los que se eliminó el gen homólogo de *pacC*, denominado *pac1*. El crecimiento *in vitro* de estos mutantes *pac1* fue normal a pH ácido, sin embargo el crecimiento fue inhibido cuando el pH del medio de cultivo se incrementó. Además, estos mutantes presentaban una drástica reducción de la virulencia en ensayos de infección de tomate y de *Arabidopsis*. En *C. acutatum*, patógeno que causa la antracnosis en los cítricos, el mutante nulo vió reducida severamente su virulencia (You *et al.* 2007).

Por lo tanto, hay casos en los que PacC actúa como regulador positivo de la virulencia (por ejemplo en *S. sclerotiorum* o *C. acutatum*), mientras que en otros casos actúa como regulador negativo (por ejemplo en *F. oxysporum*). No hay una correlación clara entre hongos acidificadores o alcalinizadores con el hecho de que PacC actué como regulador positivo o negativo de la virulencia, ya que por ejemplo hay casos de regulación negativa tanto en hongos acidificadores (por ejemplo *S. sclerotiorum*) como en alcalinizadores (por ejemplo *C. acutatum*).

## **5. Desarrollo de herramientas genómicas en hongos fitopatógenos**

En los últimos años ha habido un aumento en el interés por la investigación en genómica funcional de hongos filamentosos. Este interés se ha visto propiciado por varios avances importantes. En primer lugar, el desarrollo de sistemas de transformación ha incrementado el número de hongos filamentosos que son susceptibles de manipulación genética. Segundo, las técnicas de mutagénesis aleatoria y mutaciones de genes diana han sido adaptadas y desarrolladas como eficientes herramientas para la investigación de la función de genes en hongos. En tercer lugar destaca el hecho de que los genomas de un significativo número de hongos han sido o está actualmente siendo secuenciado.

### **5.1 Aproximaciones a la transformación genética**

El establecimiento de un método de transformación genética adecuado no es algo trivial en muchos hongos. Desde la primera descripción de transformación mediada por protoplastos en la levadura *S. cerevisiae* (Hinnen *et al.* 1978), esta técnica ha sido extendida a varios hongos filamentosos (Fincham, 1989; Ruiz-Diez, 2002). Sin embargo, la frecuencia de transformación comparada con las obtenidas con *S. cerevisiae* suelen ser extremadamente bajas. Para mejorar la transformación en hongos filamentosos se han realizado progresos en los últimos años que han resultado en el establecimiento de nuevos métodos, como son la

transformación biolística (revisión (Ruiz-Diez, 2002)) y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT; revisión (Frandsen, 2011). Estos métodos han demostrado ser valiosos para aquellas cepas de hongos en las que es difícil obtener un número suficiente de protoplastos o cuyos protoplastos no regeneran bien (MacKenzie *et al.* 2004).

Todas las técnicas tienen en común la necesidad de ser optimizadas para la cepa de hongo de interés y a menudo sólo uno o dos de estos métodos puede ser aplicado a cada especie en particular (Meyer *et al.* 2003). Es de destacar que la ATMT ha resultado ser un eficiente método de transformación para muchos hongos que eran recalcitrantes por los otros métodos descritos (Michielse *et al.* 2005). Sin embargo, la ATMT también ha demostrado ser menos eficiente o incluso nula a la hora de producir transformantes en *S. sclerotiorum* o en *A. niger* (Michielse *et al.* 2005). Por lo tanto, no hay ninguna regla general que pueda ser aplicada para predecir la utilización de una técnica de transformación en particular para una especie fúngica concreta. Pero, interesantemente, se ha detectado una alta frecuencia de eventos de integración única cuando se utilizó la ATMT para la introducción de DNA en hongos filamentosos como *A. awamori*, *A. giganteus*, *Calonectria morganii*, *F. oxysporum* etc... (Michielse *et al.* 2008; Mullins *et al.* 2001; Malonek y Meinhardt, 2001; Meyer, *et al.* 2003). Contrariamente, cuando la transformación de estos hongos se realizó mediante la utilización de protoplastos se observaron preferentemente eventos de integración multicopia (de Groot *et al.* 1998; Malonek y Meinhardt, 2001; Mullins y Kang, 2001; Meyer *et al.* 2003).

Una ventaja adicional de la ATMT es que se pueden emplear células intactas, tales como conidios o micelio, eliminando así la necesidad de generar protoplastos. El aislamiento de protoplastos es laborioso y tanto el rendimiento como la viabilidad de los mismos dependen de la calidad del preparado enzimático y el lote utilizado para su generación.

## **5.2 Recombinación homóloga y no homóloga**

La mutagénesis dirigida en hongos filamentosos se ve a menudo obstaculizada por la muy baja frecuencia de recombinación homóloga. Mientras que en *S. cerevisiae* una longitud de los fragmentos homólogos de 30-50 pb es suficiente para garantizar un alto rendimiento de recombinación homóloga (Hua *et al.* 1997), en la mayoría de hongos filamentosos son necesarios varios cientos de pares de bases y hasta varias kilobases para lograr buenas frecuencias de recombinación homóloga (Chevalet *et al.* 1992; Wu y Linz, 1993; Shiotani y Tsuge, 1995; Weidner *et al.* 1998; Young *et al.* 1998; Fernandez-Martin *et al.* 2000; Yu *et al.* 2004; Meyer *et al.* 2007). Aunque la frecuencia de recombinación homóloga en hongos filamentosos es muy baja, normalmente entre 0 y 30 %, hay mucha variabilidad en función de las especies (Asch y Kinsey, 1990; Bird y Bradshaw, 1997; Meyer *et al.* 2002; Meyer *et al.* 2007).

Para poder superar estas limitaciones una de las aproximaciones utilizadas recientemente es el uso de cepas deficientes en la vía de recombinación no homóloga o unión de extremos no

homólogos (cuyas siglas en inglés son NHEJ, de “non-homologous end joining”). La NHEJ es un sistema que repara roturas en la doble hebra de DNA y predomina sobre la recombinación homóloga. Es denominada no homóloga porque los extremos son directamente ligados sin la necesidad de un molde homólogo, en contraste con la recombinación homóloga, que requiere una secuencia homóloga para guiar la reparación. La frecuencia de recombinación homóloga es dependiente de la cepa, del locus y/o del gen marcador usado. Una alternativa versátil es la eliminación de algún componente del complejo NHEJ, como se describió por primera vez en *N. crassa* (Ninomiya *et al.* 2004). La NHEJ está mediada por un complejo multiproteico que contiene una proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK), el complejo ligasa IV-XRCC4, la exonucleasa Artemis, y el heterodímero Ku70/Ku80, que se une fuertemente al final del DNA y directamente a la DNA-PK, permitiendo una activación eficiente del complejo (Critchlow y Jackson 1998; Hsu *et al.* 2002; Meek *et al.* 2004; Daley *et al.* 2005; Hefferin y Tomkinson 2005). En *N. crassa*, la disrupción de cualquiera de los genes *ku70* o *ku80* resulta en líneas mutantes que muestran un alto grado de recombinación homóloga. Cuando se emplearon para la transformación 2 kb de ambas regiones flanqueantes del gen diana, el 100 % de los transformantes exhibieron integración en el sitio homólogo, comparado con sólo el 10-30 % encontrado en la cepa silvestre. De este modo han sido generadas cepas mutantes donde se ha eliminado el gen *ku* en muchas especies de hongos filamentosos, consiguiéndose un aumento significativo de la frecuencia de recombinación homóloga. Así, en mutantes donde se utilizaron 1000 pb de secuencia homóloga flanqueantes en las construcciones en *Aspergillus fumigatus* la frecuencia de recombinación aumentó del 10 al 96 % (Krappmann *et al.* 2006), en *Aspergillus niger* del 19 al 95 % (Meyer *et al.* 2007), en *N. crassa* del 21 al 100 % (Ninomiya *et al.* 2004) y en *Sordaria macrospora* del 4 al 100 % (Pöggeler y Kück, 2006). Hay que resaltar que el porcentaje de recombinación homóloga en las líneas silvestres está por debajo del 20 %. Sin embargo, una desventaja de los mutantes  $\Delta ku$  cuando son comparados con la cepa silvestre es su elevada sensibilidad frente a diferentes compuestos tóxicos, tales como metil metanosulfonato, etil metanosulfato y fleomicina. Una posible alternativa para solventar este problema ha sido propuesta por Janus *et al.* (2009), que han utilizado un vector inducible de RNA interferente para silenciar la expresión del gen *ku* permitiendo elevar la eficiencia de la recombinación homóloga con respecto a la cepa silvestre pero reducida si es comparada con la línea mutante  $\Delta Pcku70$ .

### **5.3 RNA interferente**

El silenciamiento de un gen no está únicamente restringido a la obtención de mutantes nulos. Una estrategia alternativa es el silenciamiento génico post-transcripcional. Este tipo de técnicas son especialmente válidas cuando fallan las aproximaciones de eliminación de genes diana, cuando el gen de interés está presente en el genoma en múltiples copias o cuando otros genes homólogos al gen diana pueden compensar la función de los genes eliminados (Akashi *et al.* 2005). En hongos filamentosos se han realizado con éxito construcciones para el silenciamiento de genes en varias especies (Zheng *et al.* 1998; Kitamoto *et al.* 1999; Bautista *et al.* 2000; Ngiam *et al.* 2000; Moralejo *et al.* 2002; Lombrana *et al.* 2004; Blanco y Judelson, 2005). Sorprendentemente, hasta la fecha no se ha detectado una reducción a cero

de los niveles de expresión mediante la utilización de este tipo de técnicas. Sin embargo, esto puede considerarse una ventaja en vista de que la eliminación de ciertos genes puede ser letal para el hongo, por lo que la atenuación de su expresión puede ser una aproximación interesante muy a tener en cuenta.

El RNA interferente (RNAi) se ha mostrado como la técnica más utilizada y potente a la hora de silenciar genes a nivel post-transcripcional en hongos filamentosos (Nakayashiki *et al.* 2005). Estos RNAs son reconocidos por una RNA polimerasa dependiente de RNA que los convierte en RNAs bicatenarios. Estos son procesados por una endonucleasa del tipo RNasa III (Dicer) en una reacción dependiente de ATP para generar moléculas bicatenarias cortas de RNA, que se denominan pequeñas moléculas de RNA interferente (siRNA), las cuales poseen una longitud entre 21-25 pb. Estos pequeños RNAs se incorporan a un complejo de RNasa multicomponente, denominado complejo de RNA inducido por silenciamiento (RISC), y sirven como guía para la degradación del RNA homólogo (Agrawal *et al.* 2003).

Hay que destacar que algunas especies de hongos, como por ejemplo *Ustilago maydis*, *Candida albicans* y *S. cerevisiae*, no poseen algunos de los componentes de la maquinaria de silenciamiento de RNAi (Nakayashiki, 2005). Sin embargo, la inhibición específica de la expresión génica mediante RNAi ha demostrado ser adecuada en un gran número de hongos filamentosos, tales como *A. nidulans* (Hammond y Keller, 2005), *A. fumigatus* (Mouyna *et al.* 2004; Bromley *et al.* 2006; Henry *et al.* 2007; Khalaj *et al.* 2007), *A. oryzae* (Yamada *et al.* 2007), *Bipolaris oryzae* (Moriwaki *et al.* 2007), *Colletotrichum lagenarium* (Nakayashiki *et al.* 2005), *Coprinus cinereus* (Namekawa *et al.* 2005; Wälti *et al.* 2006), *F. solani* (Ha *et al.* 2006), *M. oryzae* (Kadotani *et al.* 2003; Kadotani *et al.* 2004; Nakayashiki *et al.* 2005), *Mucor circinelloides* (Nicolas *et al.* 2007), *N. crassa* (Goldoni *et al.* 2004), *P. expansum* (Barad *et al.* 2012) y *Schizophyllum commune* (de Jong *et al.* 2006).

#### **5.4 Proteína verde fluorescente**

La caracterización funcional de genes de interés es un complemento importante a los estudios genéticos. La clonación del gen *gfp*, que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) y la demostración de que la proteína podía expresarse funcionalmente en procariontes (*E. coli*) y eucariotes (*Caenorhabditis elegans*) (Chalfie *et al.* 1994) ha abierto nuevas vías para la investigación de la patogenicidad de hongos filamentosos. El gen *gfp* de la medusa *Aequorea victoria* fue clonado en 1992 (Prasher, 1992) y ha revolucionado los estudios de biología celular en muchos campos, incluyendo los estudios de interacción planta-patógeno (Lorang *et al.* 2001). A diferencia de otros marcadores, tales como GUS, que normalmente requieren matar y fijar las muestras de tejidos para la detección de la expresión, la proteína GFP posee varias ventajas: primero, puede ser detectada sin dañar el tejido; segundo, es altamente estable y, tercero, la fluorescencia requiere únicamente oxígeno, luz azul o UV y no requiere otro sustrato para su visualización. La GFP facilita la observación continua de los hongos patógenos *in vivo* (Lorang *et al.* 2001). Las formas mutantes de GFP han eliminado las desventajas de la proteína silvestre para los estudios de microscopía, incluyendo inadecuados plegamientos a altas temperaturas y fotoblanqueo (Cubitt *et al.* 1995; Lippincott-Schwartz y Patterson, 2003). La proteína mutante SGFP (que presenta una

sustitución en el aminoácido 65 de una serina por una treonina) se ha hecho popular debido a la fuerte fluorescencia que confiere cuando el gen se expresa en hongos filamentosos (Fernandez-Abalos *et al.* 1998). La SGFP produce un “desplazamiento hacia el rojo” en excitación, con un máximo a 488 nm (Lorang *et al.* 2001). Esto es lo que hace a la SGFP una herramienta ideal para los estudios de microscopía confocal de hongos patógenos *in planta*. La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo con GFP en hongos han sido llevados a cabo con levaduras (Cormack, 1998). *U. maydis* fue el primer hongo filamentosos en el cual se llevó a cabo la expresión del gen *gfp* (Spellig *et al.* 1996). Actualmente, la expresión de *gfp* se ha estudiado en multitud de hongos filamentosos, incluyendo especies de los géneros *Colletotrichum* (Dumas *et al.* 1999), *Mycosphaerella* (Skinner *et al.* 1998), *Magnaporthe* (Kershaw *et al.* 1998), *Cochliobolus* (Maor *et al.* 1998), *Trichoderma* (Bae *et al.* 2000), *Podospora* (Berteaux-Lecellier *et al.* 1998), *Sclerotinia* (Vautard-Mey *et al.* 1999), *Schizophyllum* (Lugones *et al.* 1999), *Aspergillus* (Du *et al.* 1999) y *Phytophthora* (Bottin *et al.* 1999).

La detección *in vivo* a lo largo del tiempo es quizás el sello distintivo de la GFP más apreciado a la hora de estudiar la biología celular de los hongos filamentosos. Debido a su anatomía simple y al rápido crecimiento, los hongos filamentosos son adecuados para tales investigaciones. Estas cualidades se han demostrado ampliamente en *A. nidulans* (Suelmann *et al.* 1997; 2000) como sistema modelo para la investigación de las bases moleculares de la morfogénesis celular (revisión Doonan, 1992). En *Fusarium oxysporum* se visualizó el proceso completo de infección de la planta huésped por parte del hongo empleando el promotor *gpdA* de *A. nidulans* para dirigir la expresión del gen *gfp* (Di Pietro *et al.* 2001). En *Magnaporthe grisea*, que se creía que era un patógeno aéreo estricto, los estudios de Sesma y Osbourn (2004) con el marcaje con la proteína GFP han permitido demostrar que este hongo también es capaz de colonizar plantas de maíz a través de la raíz. El marcaje completo de un organismo también permite realizar estudios comparativos entre la estirpe silvestre y estirpes mutantes afectadas en el proceso de patogénesis. En *A. citri* se utilizó una cepa mutante marcada con GFP que era deficiente en una poligalacturonasa y tenía muy reducida la capacidad de causar los síntomas típicos en los cítricos en comparación con la cepa silvestre. Estos estudios revelaron que no había diferencias en la germinación de las esporas pero que la estirpe mutante era incapaz de penetrar la piel del fruto (Isshiki *et al.* 2003).

El gen *gfp* también ha sido utilizado en el análisis de expresión de genes mediante su fusión a los promotores de los mismos. Esto ha permitido el estudio de la expresión de genes que están implicados en patogénesis durante el desarrollo de la infección (Kahmann y Basse 2001; Lorang *et al.* 2001). También es posible la localización de proteínas mediante fusión a GFP y así poder comprender su función y regulación durante el proceso de patogénesis (Cormack 1998). Por ejemplo, gracias a la fusión de *gfp* al gen *Tub1*, que codifica una tubulina en el hongo filamentosos *U. maydis*, se comprobó *in vivo* cómo se producen los cambios en el citoesqueleto en la transición entre la forma levaduriforme y la forma filamentosos que ocurre durante el proceso de infección (Steinberg *et al.* 2001).



## **6. Desarrollo de técnicas -ómicas en el estudio de hongos filamentosos**

Durante los últimos años estamos asistiendo a un incremento exponencial en la disponibilidad de información genómica de multitud de organismos. Este conocimiento facilita el desarrollo de tecnologías transcriptómicas, tales como hibridación de micromatrices, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) o RNA-seq (revisión en Nowrousian, 2010; Wang *et al.* 2009; Matsumura, 2003) que suponen un salto cualitativo de nuestro conocimiento a nivel molecular y genómico. No obstante, el análisis a nivel de mRNA presenta una serie de limitaciones y la interpretación fenotípica de los resultados no es siempre adecuada. La gran cantidad de información genómica generada como consecuencia de los proyectos de secuenciación da paso a una nueva era, la de la Genómica Funcional, cuyo objetivo es la caracterización funcional de todos y cada uno de los genes de un organismo. La complejidad de dicho objetivo ha de abordarse mediante la utilización de diferentes aproximaciones “ómicas”, incluyendo estudios de cambios globales en la expresión génica (Transcriptómica), proteínas (Proteómica) y metabolitos (Metabolómica). La integración de la información obtenida a partir de estas aproximaciones permitirá conocer el funcionamiento de los organismos y su interacción con el medio.

La historia de la **genómica** en hongos es corta pero intensa. Esta carrera por descifrar el genoma de los hongos comenzó en 1992, con la publicación de la secuencia completa del cromosoma III de *S. cerevisiae* (Oliver *et al.* 1992). Pero no fue hasta el año 2000 cuando la genómica de los hongos filamentosos comenzó a ver la luz, con el proyecto denominado Fungal Genome Initiative (FGI). En la gestación de esta iniciativa participaron distintos miembros de la comunidad científica y consorcios de secuenciación, de entre los que destaca el Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, Massachusetts, EE.UU.), conocido en la actualidad como Broad Institute. Finalmente, en 2003 se hizo pública la secuencia completa del genoma de *N. crassa* (Galagan *et al.* 2003), el primero correspondiente a un hongo filamentosos.

La importancia de los estudios genómicos en hongos fitopatógenos se ha incrementado debido al aumento del número de proyectos de secuenciación de los genomas de hongos. A principios de 2010 existían 16 secuencias de genomas de hongos fitopatógenos (González-Fernández *et al.* 2010) y desde entonces muchos más proyectos están en marcha (<http://fungalgenomes.org/>). Esta cantidad de información ha permitido la identificación de cientos de genes de hongos relacionados con la patogenicidad. Algunos de estos han sido listados en varias bases de datos, como las que describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Bases de datos que describen genes relacionados con la patogenicidad en hongos.

Base de datos	Sitio web	Descripción	Referencia
<b>efungi</b>	<a href="http://img.cs.man.ac.uk/efungi/database.html">http://img.cs.man.ac.uk/efungi/database.html</a>		Hedeler <i>et al.</i> 2007
<b>Fungal genome research</b>	<a href="http://fungalgenomes.org/">http://fungalgenomes.org/</a>	Lista de genomas de hongos publicados y en proceso	
<b>Broad Institute</b>	<a href="http://www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative">http://www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative</a>		
<b>JGI fungal genomics portal</b>	<a href="http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf">http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf</a>	Genómica comparada de hongos en grupos taxonómicos específicos	
<b>PHI database</b>	<a href="http://www.phi-base.org/help.php">http://www.phi-base.org/help.php</a>	Genes involucrados en patogenicidad en animales y plantas	Winnenburg <i>et al.</i> 2008
<b>Filamentous fungal gene expression database</b>	<a href="http://bioinfo.townsend.yale.edu/index.jsp">http://bioinfo.townsend.yale.edu/index.jsp</a>	Datos de expresión génica de hongos filamentosos	Zhang y Townsend 2010

En la actualidad, una gran cantidad de proyectos de secuenciación ya han sido publicados, entre los cuales, muchos de ellos pertenecen a hongos fitopatógenos como *Ashbya gossypii* (Dietrich *et al.* 2004), *M. grisea* (Dean *et al.* 2005), *A. fumigatus* (Nierman *et al.* 2005), *A. oryzae* (Machida *et al.* 2005), *U. maydis* (Kamper *et al.* 2006), *F. graminearum* (Cuomo *et al.* 2007), *Grosmannia clavigera* (DiGuistini *et al.* 2009), *Blumeria graminis* (Spanu *et al.* 2010), *B. cinerea* (Amselem *et al.* 2011), *S. sclerotiorum* (Amselem *et al.* 2011), *Puccinia graminis* (Duplessis *et al.* 2011) y recientemente el hongo que es objeto de este estudio, *P. digitatum* (Marcet-Houben *et al.* 2012)

La información de la secuencia del genoma de un organismo es un valioso y necesario punto de partida, pero no es suficiente para responder a las preguntas relativas a la función de los genes, los mecanismos de regulación y las vías bioquímicas activadas durante la patogénesis. Por lo que el desafío actual y en el futuro próximo será descifrar la función de los miles de genes identificados por los proyectos de secuenciación de genomas.

La **transcriptómica** es la cuantificación del transcriptoma, el conjunto completo de todos los transcritos de la célula, para un estado de desarrollo específico o para una condición fisiológica determinada (Wang *et al.* 2009). Esto permite la posibilidad de identificar tanto

cualitativa como cuantitativamente diferencias en la expresión de genes cuando se comparan múltiples poblaciones de mRNAs. La transcriptómica constituye una importante herramienta para el conocimiento de los hongos fitopatógenos. El análisis de la expresión de los genes durante la infección, junto con los perfiles de expresión en una multitud de condiciones de crecimiento *in vitro*, incluyendo varias clases de estrés, ha aumentado nuestro conocimiento de los hongos fitopatógenos.

La hibridación de micromatrices ha sido la plataforma elegida para muchos estudios de transcriptómica, aunque las aproximaciones basadas en secuenciación, tales como SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, Velculescu *et al.* 1995) y otras técnicas relacionadas, como la hibridación substractiva medida por PCR supresiva (SSH, por su siglas en inglés) (Diatchenko, 1996) constituyen atractivas alternativas. Recientemente, el desarrollo de los nuevos métodos de secuenciación masiva de DNA ha proporcionado un nuevo método para el análisis de transcriptomas. Este método, denominado RNA-Seq (secuenciación de RNA), tiene claras ventajas sobre las aproximaciones existentes y se espera que revolucione el modo en el que los transcriptomas son analizados (Wang *et al.* 2009)

**La técnica SAGE** es un poderoso método de análisis de expresión de genes que permite el análisis de cientos de transcritos simultáneamente (Datson *et al.* 1999). Esta técnica se basa en la secuenciación y cuantificación de oligonucleótidos de 10 – 14 nucleótidos y la correspondencia de éstos a la base de datos de ESTs o la secuencia de genoma para identificar los genes expresados correspondientes. Este método ha sido aplicado en el estudio de algunos hongos fitopatógenos como *M. oryzae* (Irie *et al.* 2003), *B. graminis* (Thomas *et al.* 2002) y *U. maydis* (Larraya *et al.* 2005). Irie *et al.* (2003), llevaron a cabo mediante esta técnica la identificación de genes responsables de la formación del apresorio y la invasión del huésped usando el mRNA aislado de conidios germinando en presencia o ausencia de cAMP. Se identificaron varios genes que están implicados en patogénesis y que fueron inducidos por el tratamiento con cAMP, demostrando que el cAMP es requerido para la virulencia del hongo. Una limitación del SAGE es que requiere de información previa de la secuencia para poder asignar las lecturas a ORFs individuales. Por lo tanto, este proceso está restringido a las secuencias que se encuentran accesibles en las bases de datos. Esta limitación será menos problemática cuantas más ESTs sean generadas y las secuencias existentes sean anotadas. Sin embargo esta técnica tiene como ventaja que se generan bases de datos digitales lo que facilita la comparación directa entre diferentes librerías. Contrariamente, en los experimentos con micromatrices es más difícil debido a una serie de errores aleatorios y sistemáticos que son difíciles de eliminar entre los diferentes investigadores o laboratorios.

Otra técnica empleada con la finalidad de identificar a escala global qué genes se expresan diferencialmente es la hibridación substractiva medida por PCR supresiva (**SSH**). Las ventajas de esta técnica incluyen la habilidad de aislar genes sin necesidad de un conocimiento previo de su secuencia así como el uso de técnicas comunes en biología molecular que no requieren ni equipamiento ni herramientas de análisis especializado. Esta técnica ha sido usada para la identificación de genes de hongos que se expresan diferencialmente en varios patosistemas

(Beyer *et al.* 2002; Bittner-Eddy *et al.* 2003; Guilleroux y Osbourn, 2004). Cramer y Lawrence (2004) identificaron genes que se expresaban diferencialmente durante la infección del hongo necrótrofo *Alternaria brassicicola* en *A. thaliana*. Lu y colaboradores (2005) construyeron una librería sustractiva enriquecida en genes que se expresan durante la maduración del apresorio de *M. oryzae* ya que este proceso es importante para la penetración de los tejidos de la planta. Obtuvieron 71 genes que se expresaban sólo en el apresorio, algunos de los cuales ya habían sido descritos anteriormente que estaban implicados en la formación o función del mismo.

La tecnología de hibridación de micromatrices de DNA tiene un enorme potencial para la comprensión de los sistemas de interacción planta-patógeno ya que permite estudiar, de manera simultánea, la expresión de miles de genes de los dos organismos que interactúan. Esta tecnología está basada en la síntesis o fijación de sondas específicas, que representan los genes, sobre un sustrato sólido que permitirá la hibridación con la molécula diana (Rensink y Buell, 2005). Al igual que con la técnica SAGE la limitación se encuentra en que requiere de un conocimiento previo de gran parte de la secuencia del organismo a estudiar para poder llevar a cabo los análisis de expresión génica. Aquellos genes que son expresados específicamente durante la infección o bajo condiciones que mimetizan infección son candidatos a ser factores de virulencia. Aunque uno de los primeros organismos en los que se ha empleado esta técnica fue en la levadura *S. cerevisiae*, ha transcurrido mucho tiempo para el desarrollo de esta técnica en otros hongos. En una reciente revisión, Breakspear y Momany (2007) resumen los estudios con micromatrices realizados entre 2002 y 2006 en más de 20 especies diferentes de hongos filamentosos, en los que se analizan distintos procesos como son metabolismo, patogénesis, desarrollo etc.... En *M. grisea* (Takano *et al.* 2003) y *B. graminis* (Both *et al.* 2005) se han analizado empleando esta aproximación los genes relacionados con la formación del apresorio, estructura requerida por muchos hongos patógenos de plantas para la invasión del tejido del huésped. En *U. maydis* los estudios llevados a cabo con micromatrices relacionados con la privación de nutrientes, cascadas de regulación de cAMP o las respuestas al estrés oxidativo han proporcionado una nueva perspectiva sobre la patogenicidad de este hongo (Eichhorn *et al.* 2006; Hewald *et al.* 2006; Molina y Kahmann, 2007).

Sin embargo, a pesar de todas las técnicas expuestas, debido a la escasa cobertura de la secuenciación convencional y la limitada sensibilidad que ofrece la hibridación de micromatrices, es difícil aclarar completamente la complejidad funcional del transcriptoma. Por este motivo y gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS, del inglés *next generation sequencing*) y al abaratamiento de costes que han experimentado, es previsible la sustitución de la hibridación de micromatrices por secuenciación directa de la población de mRNAs mediante **RNA-seq**. Comparado con las aproximaciones convencionales para el análisis del transcriptoma, la RNA-seq ofrece varias ventajas. Primero, puede cuantificar con precisión los niveles de expresión de genes sin ruido de fondo; segundo, es una técnica muy sensible y puede detectar un rango dinámico más amplio de niveles de expresión de genes en contraste con las micromatrices. Además, puede revelar de forma mucho más precisa los límites de las regiones no traducidas incluso con un solo nucleótido de resolución tales como

límites entre exones e intrones y es útil también para revelar la compleja topografía del transcriptoma incluyendo variaciones en la secuencia tales como procesamientos alternativos o fusión de genes. Lo novedoso de esta técnica hace que la bibliografía sobre el tema sea muy limitada y que en la mayoría de los casos haya sido utilizada para generar bases de datos con la finalidad de identificar ORFs. En relación a hongos filamentosos, Wang y colaboradores (2010) analizaron el transcriptoma completo de *A. oryzae* en el que han identificado un gran número de nuevos transcritos, nuevos exones, regiones no traducidas, codones de iniciación alternativos aguas arriba etc... Este tipo de análisis indica que el transcriptoma es mucho más complejo que lo que previamente se creía. El transcriptoma del oomiceto patógeno de plantas *Phytophthora sojae* también ha sido perfilado en diez diferentes estadios tanto del desarrollo como de la infección. De todas las secuencias obtenidas se realizó una evaluación del nivel de expresión promedio de 30 familias de genes relacionados con la patogénesis que reveló que la mayoría de éstos se inducían durante la infección, pero con diferentes niveles y patrones de expresión. Además, se ha creado un servidor web con las bases de datos obtenidas con el nombre de "Base de datos Transcripcional de *Phytophthora*" (<http://phy.njau.edu.cn/ptd/>) (Ye *et al.* 2011). Otro hongo fitopatógeno en el que se ha utilizado esta técnica para el análisis del transcriptoma ha sido *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Blumeria*). Este hongo es el causante del mildiu de las gramíneas. Es un biótrofo cuyo crecimiento y reproducción es totalmente dependiente de células de plantas vivas. Se realizó una comparación con el análisis de otros dos mildius patógenos de plantas dicotiledóneas. Entre los 248 genes candidatos identificados como efectores de patogénesis en el genoma de *Blumeria*, muy pocos (menos de 10) definen un conjunto básico que es conservado en los tres hongos, lo que sugiere que la mayoría de los efectores representan adaptaciones específicas de cada especie (Spanu *et al.* 2010).

La **proteómica** se basa en el estudio del conjunto de proteínas que son producidas por el genoma de un organismo en un momento concreto y se ha convertido en una herramienta más para el estudio de la función génica. Aunque el transcriptoma provee una visión muy útil de la expresión global de la expresión de los genes, la proteómica es normalmente utilizada como una técnica complementaria que proporciona una visión completa del perfil de proteínas del organismo. Por otro lado, la diferencia básica entre genómica y proteómica es que mientras que la primera engloba el estudio de todo el patrimonio genético de un organismo (tanto nuclear como extranuclear, codificante o no codificante), la segunda se centra en las partes del genoma que se traducen a proteínas. El objetivo último de la proteómica es obtener una visión global e integrada de todos los procesos celulares (Gil, 2003). Para el aislamiento y la separación de proteínas se utilizan, básicamente, técnicas electroforéticas. El desarrollo de la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE), basada en una separación de las proteínas en función de la carga seguida de una separación en función de su masa molecular, constituyó un gran avance en el campo de la proteómica (Graves y Haytead, 2002). La proteómica, junto con otras técnicas, se ha convertido en una poderosa herramienta para proporcionar información importante sobre la patogenicidad y factores de virulencia, abriendo así nuevas posibilidades para el diagnóstico de enfermedades y la protección de cultivos. Por ejemplo, en *F. graminearum*, un importante hongo patógeno de cereales, se estudió el proteoma extracelular cuando fue crecido en

presencia de glucosa y paredes celulares de plantas (Phalip *et al.* 2005). Usando una combinación de 2D-PAGE acoplada a una cromatografía de líquidos se identificaron 103 proteínas, de las cuales 84 se derivaron del crecimiento en paredes celulares de plantas y el 45 % estaban implicadas en la degradación de paredes celulares (destacando celulasas, hemicelulasas y pectinasas). Junto con *F. graminearum* y *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* es el hongo patógeno de plantas más estudiados en el campo de la proteómica debido a las substanciales pérdidas que provoca en el mundo entero, tanto en pre como en postcosecha. El primer estudio usando esta especie data del 2006 y describió el proteoma parcial de las proteínas de extractos de micelio (Fernández-Acero *et al.* 2006). Se detectaron 400 manchas en geles de 2D teñidos con Coomassie. De un total de 60 manchas sujetas a un análisis de espectrometría de masas (MS), 22 fueron identificadas por MALDI-TOF o ionización por electroespray (ESI-MS). Algunas de estas proteínas correspondían a formas de malato deshidrogenasa (MDH), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y un tipo de ciclofilina que está relacionada con la virulencia (Fernández-Acero *et al.* 2006). En un segundo estudio, el análisis comparativo proteómico se llevó a cabo con el micelio de dos cepas de *B. cinerea* que diferían en virulencia y producción de toxinas y reveló la existencia de 73 diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en el estudio del perfil de proteínas en 2D. Un total de 28 manchas fueron identificadas por MALDI-TOF MS y ESI IT MS/MS, de las que 17 fueron identificadas como MDH y se acumulaban en la cepa más virulenta. Esta enzima cataliza la conversión reversible del oxalacetato en malato. El oxalacetato es un precursor del ácido oxálico que ha sido descrito como un factor de patogenicidad en *B. cinerea*. Cuatro de las manchas fueron identificadas como GADPH. La GAPDH influye en muchos procesos celulares como el ciclo de la glicolisis, pero además actúa como un factor de virulencia en diferentes organismos (Fernández-Acero *et al.* 2007). En el tercer trabajo, la secreción de conjuntos de proteínas discretos fue inducida por la introducción controlada de distintas fuentes de carbono y varios inductores de origen vegetal (glucosa, almidón, pectina, pared celular de tomate (TCW) y carboximetilcelulosa (CMC)) (Fernández-Acero *et al.* 2010). Los correspondientes perfiles de proteínas de 2D mostraron un incremento en el número y variedad de manchas cuando se utilizaron TCW y CMC. La secreción de proteínas, en su mayor parte enzimas de degradación de la pared celular, fue similar con los tratamientos de glucosa, almidón y pectina. Sin embargo, en los tratamientos en los que se utilizaron TCW o CMC como única fuente de carbono, se detectaron más proteínas con el primer tratamiento que con el segundo. Un total de 78 manchas fueron identificadas por análisis MALDI-TOF/TOF MS/MS, correspondiendo a 56 proteínas únicas. Algunas de las proteínas estaban involucradas en los procesos de patogenicidad (por ejemplo, pectin metilesterasas, xilanasas o proteasas).

Además de los proteomas de especies concretas de hongos, también se han desarrollado aproximaciones de proteómica comparativa que han servido para el estudio de varios patosistemas, como son arroz-*M. grisea* (Agrawal y Rakwal 2006), *Brassica carinata*-*Leptosphaeria maculans* (Subramanian *et al.* 2004), maíz-*Fusarium verticillioides* (Campo *et al.* 2004), *Medicago truncatula*-*Aphanomyces euteiches* (Colditz *et al.* 2004), trigo-*Puccinia triticina* (Rampitsch *et al.* 2006) y trigo-*Fusarium graminearum* (Wang *et al.* 2005).

Los datos obtenidos mediante aproximaciones proteómicas también están siendo utilizados como aplicación a la secuenciación de genomas para mejorar sus anotaciones (es lo que se denomina proteogenómica). Los datos de los péptidos proporcionan evidencias definitivas sobre la dirección de la traducción, los sitios de comienzo y de fin, así como los límites entre exones e intrones. Esta aproximación se ha descrito ya en varias publicaciones y ha demostrado ser una herramienta eficiente para la anotación del genoma (Wright *et al.* 2009).

La **metabolómica** es la última técnica que está siendo aplicada en los estudio de genómica funcional. Metabolómica es el término usado para describir la identificación y cuantificación del metaboloma. El metaboloma, a su vez, se define como el complemento cuantitativo de los metabolitos de bajo peso molecular presentes en una célula bajo unas condiciones fisiológicas dadas (Kell *et al.* 2005; Oliver *et al.* 1998). La metabolómica debe ser utilizada como una técnica complementaria de otras técnicas genómicas funcionales como por ejemplo la proteómica y la transcriptómica, porque ofrece ventajas sobre las otras técnicas ya que el metaboloma está directamente relacionado con el fenotipo. El flujo metabólico está regulado no sólo por la expresión de los genes, sino también por los eventos post transcripcionales y post traduccionales. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**GC-MS**) es una técnica versátil utilizada para el estudio de metabolitos volátiles, metabolitos polares y apolares térmicamente estables (Throck y Sparkman, 2007). Esta es la técnica más comúnmente usada para el estudio de los metabolitos de hongos fitopatógenos y consiste en el análisis de los volátiles que se producen en la interacción hongo-planta. Varios estudios han mostrado que la presencia de determinados volátiles puede ser asociada con una enfermedad en concreto. Gracias a estas características la GC-MS ha sido utilizada en varios estudios para poder discriminar los patógenos oportunistas de los que no lo son en el caso de enfermedades fúngicas con un amplio rango de huéspedes (De Lacy Costello *et al.* 2001; Lui *et al.* 2005; Moalemiyan *et al.* 2006, 2007; Prithiviraj *et al.* 2004; Vikram *et al.* 2006). Otra técnica que constituye una potente herramienta para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles de mezclas complejas es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (**HPLC-MS**). Sin embargo, es justo indicar que las limitaciones de esta técnica han llevado a un mayor uso y aplicación de la ionización por electroespray utilizada en espectrometría de masas. Además, hasta la fecha no se ha aplicado esta técnica a ningún proyecto integral relacionado con la metabolómica de hongos fitopatógenos. Sin embargo, se ha utilizado para examinar y detectar metabolitos secundarios (Nielsen y Smedsgaard, 2003).

El análisis directo de una muestra mediante ionización por electroespray (**ESI**) acoplada a espectrometría de masas (**ESI-MS**) es una técnica analítica de alto rendimiento que resuelve mezclas complejas en sus diferentes componentes según la masa de los iones sin una separación previa por cromatografía, lo que supone una ventaja, ya que como cualquier otra técnica separativa, la cromatografía introduce un sesgo en la muestra analizada (Koulman *et al.* 2007). Uno de los primeros ejemplos descritos en el uso de la ESI-MS en hongos fue presentado por Smedsgaard y Frisvad (1996). Los autores extrajeron metabolitos de 10 especies diferentes de *Penicillium*, pero no fue hasta años después cuando esta técnica fue utilizada para el estudio de la interacción de hongos fitopatógenos. En un estudio reciente

Cao y colaboradores (2008) utilizaron la ESI-MS para caracterizar el metaboloma de tres tejidos diferentes de centeno durante la interacción con el hongo endófito *Neotyphodium lolii*. La técnica reveló la presencia de varios componentes en las plantas infectadas, incluyendo manitol así como peramina y perlolina. Los autores también identificaron iones que no podían ser sometidos a una mayor fragmentación, lo que dificulta los intentos de determinar la identidad del compuesto.

Otra técnica menos utilizada actualmente pero que marcó el comienzo de las aproximaciones metabolómicas como una herramienta en bioquímica fue la resonancia magnética nuclear (**RMN**) (Dunn y Ellis, 2005). La RMN es una técnica espectroscópica que identifica particularmente las uniones átomo-átomo lo que la diferencia del resto de técnicas de espectroscopía de masas además de no ser una técnica destructiva y requerir poca cantidad de muestra en sus preparaciones. La aplicación de la RMN para el estudio de las enfermedades de hongos de plantas está aún en su infancia y no existen hasta la fecha muchas investigaciones sobre el tema (Tan *et al.* 2009). Keon y colaboradores (2007) han estudiado el contenido nutricional del apoplasto durante la infección de trigo por *Mycosphaerella graminicola*. Recogieron muestras durante la fase latente y en la fase necrotrófica de la interacción. El análisis de las muestras recogidas durante la fase necrotrófica identificó un significativo incremento en muchos componentes como glucosa, fructosa y muchos aminoácidos comparado con la fase latente.

Quizás la novedad más interesante en el campo de la metabolómica es la aplicación de la espectroscopía de masas por resonancia de la transformada de Fourier ión ciclotrón (**FT-ICR-MS**). La FT-ICR-MS ofrece la resolución para determinar inequívocamente la fórmula química para el ión molecular de un compuesto (Throck y Sparkman, 2007). Esta técnica no ha sido aplicada aún al estudio de hongos fitopatógenos, pero su potencial es claro.



**OBJETIVOS**

---

Los Objetivos que se abordan en esta Tesis doctoral son:

- 1.- Desarrollo de nuevas herramientas genómicas para el estudio de *P. digitatum*.
- 2.- Estudio de la implicación de la regulación génica por pH ambiental como factor de patogenicidad/virulencia en *P. digitatum*.
- 3.- Aislamiento e identificación de genes de *P. digitatum* implicados en patogenicidad/virulencia frente a frutos cítricos.
- 4.- Aislamiento y caracterización de genes seleccionados mediante disrupción génica.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## **1. Organismos:**

### **1.1. Material vegetal.**

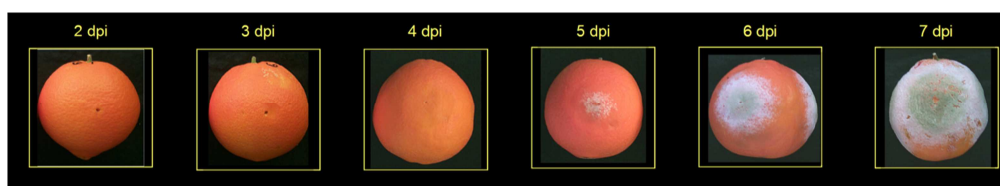
En los experimentos de infección de frutos cítricos por *P. digitatum* se emplearon frutos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de las variedades “Navelina”, “Navel” y “Navelate” procedentes de la cooperativa citrícola de Llíria (Valencia).

Todos los frutos se procesaron el mismo día de su recolección y no fueron sometidos a ningún tratamiento postcosecha. Se hizo una selección de aquellos frutos sanos que no presentaban daños visibles. Seguidamente se lavaron con una solución de lejía al 5 % durante 5 min para su desinfección, se enjuagaron con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche.

### **1.2 Microorganismos**

#### **1.2.1 Hongos**

Los frutos se infectaron con el hongo *P. digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., agente causal de la podredumbre verde de los frutos cítricos durante la postcosecha (Figura 4). Se emplearon 2 aislados diferentes: el aislado Pd1 (CECT 20795), procedente de un pomelo infectado y resistente a los fungicidas imazalil, tiabendazol y parcialmente a azoxiestrobina (Sánchez-Torres y Tuset, 2011), fue cedido por la Dra. Sánchez-Torres, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias; y el aislado PHI-26 (CECT 20796) procedente de una naranja infectada y aislado en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA (López-García, 2000). Del mismo origen que el anterior también ha sido utilizado el aislado PHI-1 de *P. italicum* Wehmer (López-García, 2000), patógeno de cítricos, procedente de una naranja infectada. Además, se empleó el hongo fitopatógeno *P. expansum* Link, aislado CMP1 (Teixidó *et al.* 1998), cedido por la Dra. Viñas, de la Universidad de Lleida, que causa la podredumbre azul en manzanas y también en condiciones de inoculación artificial es capaz de infectar frutos de naranja, aunque con una incidencia mucho menor que las dos especies anteriores.



**Figura 4.** Evolución de la infección en frutos cítricos inoculados con *P. digitatum*

Todos los aislados fueron cultivados en placas Petri con medio de cultivo PDA (“agar patata dextrosa”, Difco Laboratorios Inc.) a partir de muestras glicerizadas de conidios conservadas

a -80 °C. Una vez sembrados los conidios, las placas se incubaron a 24 °C durante 7 días. Los conidios para cada experimento se obtuvieron el mismo día de la infección rascando la superficie del medio de cultivo con una espátula estéril. Se añadieron a un tubo con agua y se filtraron a través de malla de nailon para eliminar las hifas y restos de agar. El recuento de conidios se realizó con un hematocitómetro en un microscopio y se realizó una dilución hasta la concentración deseada.

### **1.2.2 Bacterias**

Para los experimentos de transformación de *P. digitatum* se utilizaron 3 cepas diferentes de *A. tumefaciens* (EHA105, LBA4404 y AGL1). Las tres cepas son resistentes al antibiótico rifampicina y la cepa AGL1 además es resistente a carbenicilina.

Para la creación de las genotecas de DNA genómico de *P. digitatum* (PD1G) los fósmidos fueron transformados en la cepa comercial *E. coli* EPI300-T1 (Epicentre Biotechnologies). En el resto de experimentos de clonación se empleó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*.

## **2. Infecciones de frutos cítricos con *P. digitatum***

En los experimentos de infección de frutos de naranja se utilizaron diferentes variedades que se detallarán en cada apartado. Se inoculó una suspensión de 10  $\mu$ L de conidios de *P. digitatum* procedentes de una suspensión ajustada a la concentración necesaria. En el experimento para la construcción de la genoteca sustractiva de cDNA esta concentración fue de 10<sup>6</sup> conidios/mL y para el resto de experimentos de 10<sup>4</sup> ó 10<sup>5</sup> conidios/mL. Estas inoculaciones se realizaron en heridas previas practicadas en el fruto en la zona ecuatorial de la corteza con un clavo de 3 mm de profundidad. En general, se inocularon 3 réplicas de 5 frutos con 4 heridas por fruto, excepto en el experimento diseñado para construir la genoteca sustraída de cDNA, en el que se realizaron más heridas ya que la finalidad era la obtención de tejido y no la medición del avance de la infección. Finalmente los frutos fueron almacenados en cajas de plástico y mantenidos a 90 % de humedad relativa (RH) y 20 °C, que son las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo, durante 7 días (Figura 5).



**Figura 5.** Imágenes representativas de la metodología seguida en los ensayos de infección de frutos cítricos con *P. digitatum*. A. Los frutos se seleccionaron del Campo de Líría (Valencia). B. Lavado y desinfección de los frutos en balsa con una solución de lejía comercial diluida al 5 %. C. Los frutos se dejan secar hasta el día siguiente. D. A lo largo del ecuador se realizan 4 heridas por fruto de 3 mm de profundidad con un clavo estéril. E. En las heridas se inoculan 10  $\mu$ L de una suspensión de conidios del hongo. F. Los frutos almacenados en cámaras a 20°C y 90 % humedad relativa, durante 7 días

### **2.1. Toma de muestras.**

#### **2.1.1 Tejido fruto de naranja infectado con *P. digitatum***

Para la toma de muestras de frutos, a diferentes tiempos tras la inoculación se extrajeron discos de tejido de la corteza con un sacabocados de 7 mm de diámetro centrado en el punto de la herida, conteniendo tanto el flavedo, parte externa coloreada de los frutos, como el albedo, parte interna blanquecina de la corteza. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se trituró con un molinillo hasta conseguir un polvo. Seguidamente se guardó a -80 °C hasta su utilización.

### **2.1.2 Micelio de *P. digitatum***

Para la obtención de micelio del hongo para realizar las extracciones de RNA se inoculó un matraz de 500 mL de PDB con una concentración de  $10^5$  conidios/mL. Los cultivos fueron incubados a 24 °C y 200 rpm durante 72 h. Para la extracción de DNA el hongo se cultivó con las mismas condiciones pero usando medio GPY (glucosa 10 gr/L, peptona 5 gr/L, extracto de levadura 2 gr/L, pH 7,5) durante 48 h. El micelio del hongo fue filtrado a través de malla de nailon, enjuagado con agua estéril y secado. La pasta resultante se troceó y se congeló en nitrógeno líquido. A continuación el tejido se guardó a -80 °C hasta su utilización.

### **2.2 Análisis estadístico**

Los datos de incidencia de las infecciones correspondieron al valor medio de tres réplicas de cinco frutos con cuatro heridas por fruto. El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico "Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó un estudio de la homogeneidad de la varianza y, si ésta era homogénea, se empleó el test LSD, considerándose significativas las diferencias cuando  $p < 0,05$ .

## **3. Aislamiento de ácidos nucleicos**

### **3.1 RNA de fruto (infectado y no infectado) y de micelio**

Se tomaron muestras de 2 gr de tejido de naranja o 1 gr en el caso de micelio. Para cada tejido se procedió del mismo modo. El tejido pulverizado se añadió a una mezcla precalentada a 65 °C consistente en 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM, EDTA 50 mM, sarcosyl 2 % (p/v), polivinil-pirrolidona 40 1 % (p/v),  $\beta$ - mercaptoetanol 1 % (v/v)) y 5 mL de fenol equilibrado con Tris en un tubo de propileno de 50 mL. Después de la homogeneización con un Politrón PT 45/80 (Kinematica AG, Littau-Lucerne) durante 1 min, el extracto se incubó 15 min a 65 °C, se dejó enfriar en hielo y se añadieron 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v). El homogeneizado se centrifugó 20 min a  $3900 \times g$  a 4 °C y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 10 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). El RNA fue precipitado de la fase acuosa mediante la adición de cloruro de litio a una concentración final 3 M y posterior incubación durante 20 h a -20 °C. Pasado este tiempo se centrifugó a 4 °C durante 60 min a  $27200 \times g$ . El precipitado se traspasó a un tubo de 1,5 mL con 500  $\mu$ L de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar durante 5 min a  $17900 \times g$ . El sedimento resultante se lavó con acetato sódico 3M pH 6,0 para eliminar polisacáridos, se centrifugó 5 min a  $17900 \times g$ , se lavó con etanol al 70 % y el RNA se resuspendió en 40-80  $\mu$ L de agua mili Q estéril y se guardó a -80 °C hasta su utilización. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente mediante un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en presencia de bromuro de etidio.

### **3.2 RNA de conidios**

Los conidios obtenidos de una placa Petri a los 7 días de incubación en PDA se añadieron a una mezcla precalentada de 750  $\mu$ L de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM, EDTA 50 mM, sarcosyl 2 % (p/v), polivinil-pirrolidona 40 1 % (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 1 % (v/v)) y 375  $\mu$ L de fenol equilibrado con Tris en un eppendorf con 5 bolas de acero de 2,7 mm. Se agitó la muestra en un disruptor de células (BeadBeater, Biospec) durante 1 min y se dejó a 65 °C durante 15 min. Se dejó enfriar en hielo y se añadieron 375  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v). El homogeneizado se centrifugó 10 min a 12000 rpm a 4 °C y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 800  $\mu$ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). Nuevamente, el homogeneizado se centrifugó 10 min a 12000 rpm y a la fase acuosa se le añadió 100  $\mu$ L de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de etanol frío (1000  $\mu$ L) y se dejó incubar 1 h a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifugó 15 min a 12000 rpm, se lavó el precipitado con etanol al 70 % y el RNA se resuspendió en 600  $\mu$ L de TES (10 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 0,1% SDS; pH 7,5) y el El RNA fue precipitado mediante la adición de cloruro de litio a una concentración final 3 M y posterior incubación durante 20 h a -20 °C. Pasado este tiempo se centrifugó 60 min a 17900 x g, se lavó el precipitado con etanol al 70 % y el RNA se resuspendió en 25  $\mu$ L de agua mili Q estéril y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

### **3.3 Purificación de mRNA**

La purificación de mRNA se realizó mediante el uso del *kit* "Dynabeads Oligo(dT)" (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El mecanismo de purificación se basa en la unión selectiva de las colas poly A del mRNA a los residuos del oligo (dT), que a su vez está unido covalentemente a la superficie de la matriz de las columnas.

### **3.4 Extracción de DNA genómico de *P. digitatum***

A 1 gr de muestra pulverizada de micelio se añadió 10 mL de TES (100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 2% SDS), 100  $\mu$ L de mercaptoetanol y 50  $\mu$ L de proteinasa K (20  $\mu$ g/ $\mu$ L). La mezcla se incubó durante 1 h a 60 °C con agitación suave. A continuación se añadieron 3,9 mL de NaCl 5M y 1,4 mL de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 10 % (p/v) y se incubó 10 min a 65 °C. Posteriormente se añadió 15 mL cloroformo: alcohol isoamílico(24:1) y se incubó 30 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 15000 rpm y 4 °C y al sobrenadante se le añadió un volumen de NH<sub>4</sub>OAc 5 M y se incubó 1 h en hielo. Tras la incubación se centrifugó 15 min a 15000 rpm y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante al que se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol. A continuación se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min. El sobrenadante de la centrifugación se eliminó y se lavó el precipitado con 2 mL de etanol al 70 %, se centrifugó y se resuspendió con 490  $\mu$ L de TE y 10  $\mu$ L de RNasa A (10 mg/mL). Se dejó proceder con la digestión del RNA al menos 1 hora a 37 °C, hasta que se resuspendió bien todo el precipitado.



Una vez resuspendido el precipitado se procedió a fenolizar las muestras. Se les añadió 1 volumen de fenol-cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 15 min a 12000 rpm y se volvió a extraer la fase acuosa con 500 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Tras agitar la mezcla se centrifugó 10 min a 12000 rpm. A la fase acuosa se le añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 (50 µL) y 0,6 volúmenes de isopropanol (350 µL). Se mezcló muy despacio y se centrifugó 5 min a 12000 rpm. Descartamos el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70 %. Tras centrifugar 5 min a 12000 rpm y retirar todo el etanol, se añadió 200 µL de TE, incubándose a 37 °C hasta que se disolvió por completo el DNA. La cuantificación del DNA se llevó a cabo con el reactivo picogreen (invitrogen), que es un compuesto fluorescente que se une con mucha mayor afinidad a los ácidos nucleicos de doble cadena, por lo que la cuantificación es mucho más precisa que mediante espectrofotometría, que cuantifica cualquier tipo de ácido nucleico.

### **3.5 DNA genómico de *P. digitatum* a pequeña escala**

Una vez se realizó la transformación de *P. digitatum* mediante *A. tumefaciens* se seleccionaron los transformantes positivos crecidos en las placas de PDA suplementadas con higromicina (100 µg/mL) y cefotaxima (200 µg/mL). Con un palillo se tocó la superficie y los conidios recogidos se inocularon en 500 µL de medio GPY suplementado con higromicina (100 µg/mL) y se incubó 2 días a 24 °C con agitación. Tras centrifugar 5 min a 12000 rpm y retirar todo el sobrenadante se resuspendió el precipitado con 300 µL de TNES (200 mM Tris.HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y se añadieron 5 bolas de acero de 2,7 mm. Se agitó la muestra en un disruptor celular (BeadBeater, Biospec) durante 2 min y se centrifugó 10 min a 12000 rpm. A continuación al sobrenadante se le añadió 150 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, y se incubó 10 min a -20 °C. Se centrifugó la muestra 10 min a 12000 rpm y al sobrenadante se le añadió un volumen de isopropanol. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 min, se lavó el precipitado con etanol al 70 %, se centrifugó y se resuspendió el DNA con 100 µL TE.

## **3. 6 Purificación de DNA plasmídico**

### **3.6.1 Purificación de plásmidos a gran escala mediante lisis alcalina**

Se inoculó una colonia de *E. coli* en 3 mL de LB + kanamicina (25 µg/mL), se dejó crecer toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 500 mL de LB + kanamicina (25 µg/mL) con 1 mL del precultivo y se dejó incubando toda la noche con agitación a 37 °C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 4000 x g y 4 °C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células con 100 mL de tampón STE frío (NaCl 0,1 M, TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugó de nuevo. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 20 mL de tampón ALS-I (Glucosa 50 mM, TrisHCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) y 400 µL de lisozima (10 mgr/mL) Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente para lisar las células, se añadió 40 mL de tampón ALS-II (NaOH 0,2 M, SDS 1 %) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. A continuación se añadió 30 mL de tampón ALS-III (acetato potásico 3 M, ácido acético glacial 11,5 % p/v, pH 4,8) frío para precipitar las proteínas y tras

10 min en hielo se centrifugó 15 min a 5000 x g. El sobrenadante se filtró por malla de nailon y se le añadió 55 mL de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifugó a 6000 x g durante 20 min y se lavó el precipitado con etanol al 70 %. Una vez eliminado todo el etanol se disolvió el precipitado en 2,5 mL de TE y se le añadió 40 µL de RNasa A (10 mgr/mL) y se incubó toda la noche a la temperatura ambiente. Al día siguiente se fenolizó con 2,5 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1; v:v:v). Tras una centrifugación durante 5 min a 4000 x g se recuperó la fase acuosa y se le añadió de nuevo 3 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; v:v). Después de centrifugar 5 min a 4000 x g se recuperó la fase superior y se le añadió 300 µL de acetato sódico 3 M a pH 5,2, y 1,8 mL de isopropanol. Tras una centrifugación, se lavó el precipitado con etanol 70 % y finalmente se resuspendió en agua estéril. Una vez obtenidas las muestras se cuantificaron utilizando el reactivo picogreen.

### **3.6.2 Purificación de plásmidos a pequeña escala mediante lisis alcalina**

Se utilizó el kit comercial “Genelute Plasmid Miniprep Kit” (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **3.7 Purificación de DNA de fósmidos**

### **3.7.1 Purificación de DNA de fósrido a gran escala por lisis alcalina**

Para la obtención de los fósmidos de los clones que poseían cada uno de los genes de interés se inoculó una colonia en 10 mL de medio LB + cloranfenicol (12,5 µg/mL) y se dejó incubando toda la noche con agitación a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 5 mL de este cultivo en 45 mL de medio LB + cloranfenicol (12,5 µg/mL) y 50 µL de 1000X “CopyControl Induction Solution” para inducir la multiplicación del fósrido y se incubó 5 h con agitación a 37 °C y 200 rpm en una matraz de 250 mL para obtener una buena aireación. Una vez se indujo la multiplicación del fósrido se centrifugó el cultivo 5 min a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 3,6 mL GET (50 mM glucosa, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) y 0,4 mL de lisozima recién preparada (a 10 mgr/mL de lisozima en 10 mM Tris pH 8,0). Después de incubar 5 min en hielo se añadió 8 mL de solución de lisis (0,1 N NaOH + 1 % SDS), se mezcló agitando por inversión y se dejó 5 min en hielo. Para la precipitación de proteínas se añadió 6 mL acetato potásico 5 M, dejándolo actuar aproximadamente 10 min en hielo. Para eliminar los restos celulares se filtró con malla de nailon a un tubo nuevo y se precipitaron los ácidos nucleicos con 0,6 volúmenes de 2-propanol (aprox. 11 mL) y se incubó a – 80 °C durante 30 min. Se centrifugó 10 min a 15000 rpm y a 4 °C. Se lavó el precipitado con 500 µL de etanol al 70 % y tras una breve centrifugación y eliminación del etanol restante se resuspendió el precipitado con 500 µL de TE conteniendo aproximadamente 50 µgr RNAasa (10 mgr/mL). Después de incubar a 37 °C al menos 2 horas se añadió un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25: 24: 1), se agitó vigorosamente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se trató con 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico y se procedió como antes, agitar, centrifugar y recuperar la fase acuosa. Para purificar el DNA de los fragmentos de RNA se añadió medio volumen de una solución conteniendo PEG 8000 al 40 % en MgCl<sub>2</sub> 30 mM. Se agitó bien y se incubó a 4 °C durante 1 h. La mezcla se centrifugó 20 min a 12000 rpm y se lavó el

precipitado con 500 µl de etanol 70 %. Se eliminó todo el etanol y resuspendió en 400 µl de agua. Mediante espectrofometría y un gel de agarosa al 0,7 % se cuantificó la muestra y comprobó que no hubiese degradación de la misma.

### **3.7.2 Purificación de DNA de fósido a media escala por el método de ebullición**

Se inoculó 3 µL de cada uno de los tubos de la genoteca PD1G en 3mL de medio LB + cloranfenicol (12,5 µg/mL), se dejó crecer toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se inoculó 10 mL de LB + cloranfenicol (12.5 µg/mL) con 1,5 mL del precultivo y 10 µL de CopyControl Induction Solution 1000X para la multiplicación del fósido y se incubó 5 h con agitación a 37 °C y 70 rpm en una placa de Petri. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 4000 x g y 4 °C, descartando el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 700 µL de STET (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1M EDTA y 5 % de Triton 100x) y 50 µL de lisozima (10 mg/mL). Los tubos se incubaron en agua hirviendo durante 40 s, tras los cuales se centrifugó 10 min a 12000 rpm. Se añadió al sobrenadante 40 µL de acetato sódico 3 M y 400 µL de isopropanol, incubándose toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugó la muestra para precipitar los ácidos nucleicos y posteriormente se lavó con etanol al 70 %. Una vez eliminado todo el etanol se resuspendió el DNA con 50 µL de una mezcla de TE y RNAsa A y se dejó disolver a 37°C.

### **3.7.3. Purificación de DNA de fósido a media escala sin amplificación previa**

Se inoculó una colonia en 50 mL LB suplementado con cloranfenicol (12,5 µg/mL) y se incubó a 200 rpm y 37 °C durante unas 14 h. Se centrifugó el cultivo 5 min a 10000 rpm. Al precipitado le añadió 3,6 mL GET (50 mM glucosa, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) y 0,4 mL de lisozima recién preparada (a 10 mg/mL de lisozima en 10 mM Tris pH 8,0). Tras incubar 5 min en hielo se añadieron 8 mL de 0,1 N NaOH conteniendo SDS al 1 % (p/v). Se mezcló por inversión y se dejó 5 min en hielo. Se añadieron 6 mL de acetato de potasio 5 M y se incubó 10 min en hielo. Se filtró con malla de nailon y se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol, incubándose a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó 10 min a 15000 rpm y a 4 °C y el sobrenadante se lavó con 500 µl de etanol al 70 %. Se centrifugó 5 min a 15000 rpm y 4 °C y se resuspendió el precipitado con 80 µl de TE conteniendo aproximadamente 5 µl de RNAsa A (10 mg/mL) durante toda la noche a 37 °C.

## **4. Análisis Northern**

### **4.1. Preparación de las membranas**

Las muestras de RNA desnaturizado (10 µgr) se separaron en geles de agarosa al 1,2 % (p/v) en tampón ácido 3-morfolino-propano-sulfónico (MOPS: MOPS 0,02 M, acetato sódico 10 mM, pH 7,0) conteniendo formaldehído 1,2 M según protocolos habituales (Sambrock *et al.* 1989). Una vez finalizó la electroforesis, el RNA fue transferido a una membrana de nailon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) usando 20X SSC (cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0) como medio de transferencia. El RNA se fijó a la membrana mediante

irradiación con una dosis de  $120000 \mu\text{J cm}^{-2}$  de luz UV en un Crosslinker UVC 500 (Hoefer Inc.).

#### **4.2 Marcaje de sondas**

Las sondas se marcaron con  $\alpha^{(32)\text{P}}$ -dATP mediante amplificación lineal de DNA monocatenario usando el *kit* 'Strip-EZ PCR' (Ambion, Inc.). El cebador empleado fue FOR17 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') para marcar las sondas correspondientes al 26S rDNA de *C. sinensis* y al 28S rDNA de *P. digitatum* y N2R (5' AGC GTG GTC GTC GTC GCG GCC CGA GGT 3') para el resto de sondas. Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una hibridación a 52 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C durante 1 min. Finalmente se llevó a cabo una extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR obtenidos se purificaron empleando columnas 'Microspin™ S 300 HR' (Amersham-Pharmacia Biotech). Para determinar la radiactividad de las sondas se empleó un contador de centelleo líquido 1409 Rackbeta LKB (LKB Wallac).

#### **4.3 Hibridaciones y análisis de datos**

Las membranas se prehibridaron en tubos de hibridación durante 1 h con 10 mL de la solución "Ultrasensitive Hybridization Buffer" (Ambion Inc.) a 42 °C. Seguidamente se cambió la solución por otros 10 mL de solución precalentada y se añadió la sonda radiactiva a una concentración final de  $10^6$  dpm/mL y se dejó hibridar durante 16 h a 42 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 min a temperatura ambiente con una solución 2 X SSC, SDS 0,1 % (p/v), seguidos de un lavado de 30 min a 55 °C con una solución 0,1 X SSC, SDS 0,1 % (p/v). Finalmente se realizó otro lavado de 30 min a 65 °C con 0,1 X SSC, SDS 0,1 % (p/v).

Una vez lavadas las membranas, se sellaron en plástico, se expusieron en pantallas "BAS MP 2040 Imaging Plate" (Fuji Photo Film Co., LTD.), que fueron posteriormente densitometradas en un equipo FLA-3000 (Fuji Photo Film Co., LTD.). La intensidad de las señales de hibridación se cuantificó con el programa Image Gauge V4.0 (Science Lab 98, Fuji Photo Film Co., LTD.). La eliminación de las sondas radiactivas de las membranas se llevó a cabo mediante el uso de las soluciones provistas en el *kit* de marcaje "Strip-EZ PCR" (Ambion Inc.) según las instrucciones del proveedor y se guardaron a 4 °C para nuevas hibridaciones.

Las últimas hibridaciones de cada membrana se realizaron con la sonda correspondiente al RNA ribosómico 28S de *P. digitatum*. En las hibridaciones con estas sondas se empleó como tampón de prehibridación y de hibridación el descrito por Church y Gilbert (1984) consistente en fosfato sódico 0,3 M pH 7,2, SDS 7 % (p/v) y EDTA 1 mM. La concentración de la sonda en la solución de hibridación fue aproximadamente  $10^5$  dpm/mL. La temperatura empleada en ambas etapas fue de 68 °C. El lavado de los filtros consistió en una incubación de 15 min a temperatura ambiente en 2 X SSC conteniendo SDS 0,1 %, seguido de una incubación de 30 min a 68 °C con la misma solución. Finalmente se efectuó un último lavado de 30 min a 68 °C en 0,1 X SSC conteniendo SDS 0,1 %. Las membranas se procesaron de la forma descrita anteriormente. Para la normalización de los valores relativos de acumulación

de cada mRNA se dividió la señal de hibridación de la banda por la obtenida utilizando como sonda el fragmento ribosómico del hongo.

## **5. Obtención de células competentes y transformación**

### **5.1 Preparación y transformación de células quimio-competentes de *E. coli***

Se inoculó 5 mL de LB con la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 2 matraces con 100 mL de medio LB precalentado a 37 °C con 1 mL del precultivo y se incubó a 37 °C con agitación hasta que la A<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,3-0,4. Se incubaron los cultivos en hielo durante 15 min para detener el crecimiento y seguidamente se centrifugaron a 4500 rpm y 4 °C durante 15 min, tras los cuales se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 30 mL de tampón Tf1 frío (RbCl 0,1 M, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, KAc 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicerol 15 %). Se volvió a centrifugar las células a 4500 rpm 15 min y a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de Tf2 frío (RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, Glicerol 15 %, MOPS 10 mM). Finalmente se guardaron las células a -80 °C en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos de 1,5 mL previamente enfriados.

Para la transformación se descongeló en hielo un alícuota de las células quimio-competentes guardadas a -80 °C. A continuación se les añadió la cantidad necesaria del DNA del plásmido y se dejó en hielo durante 30 min. Se incubó la mezcla en un baño de agua a 42 °C durante 45s y se transfirió directamente a hielo durante 1 min. Inmediatamente después del choque térmico se añadió 450  $\mu$ L de medio SOC (Sambrook, 1989) y se incubó a 37 °C durante 1 hora a 200 rpm para la recuperación de las células. Una vez pasado este tiempo se sembró en placas con medio LB conteniendo el antibiótico de selección y se incubaron a 37 °C durante 1 día.

### **5.2 Preparación de células electro-competentes de *E.coli***

Se inoculó 5 mL de LB con la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente se inoculó 1 matraz de 500 mL del mismo medio con 2,5 mL del precultivo y se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta que la A<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,5. A continuación se enfrió el cultivo en hielo durante 15 min y se transfirió a dos botellas estériles de 250 mL, que se centrifugaron 15 min a 3000 rpm y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en una pequeña cantidad de glicerol (10 % p/v) frío estéril. Una vez resuspendidas las células se unieron en una única botella de centrifuga con 250 mL de 10 % glicerol frío. Se volvió a centrifugar las células a 3000 rpm y 4 °C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células con 100 mL de glicerol al 10 % y fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min y a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante las células se lavaron en 2 mL de glicerol al 10 % durante 1 h y se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ L en tubos de 1,5 mL previamente enfriados a -20 °C que se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación se descongeló en hielo un alícuota de las células electrocompetentes guardadas a -80 °C. A continuación se les añadió el DNA del plásmido y se traspasó en frío la mezcla a la cubeta de electroporación evitando la formación de burbujas. La electroporación se realizó con un aparato Gene Pulse II (Biorad) empleando las siguientes condiciones: Voltaje 2500 V; Capacitancia 25 µF; Resistencia 200 W. Inmediatamente después del pulso se añadió 450 µL de medio SOC (Sambrook, 1989) y se traspasó el contenido de la cubeta a un tubo de 1,5 mL que se incubó a 37 °C durante 1 h a 200 rpm para la recuperación de las células. Una vez pasado este tiempo se sembró en placas con medio LB conteniendo el antibiótico de selección y se incubaron a 37 °C durante 1 día. Tras la comprobación por PCR de las colonias seleccionadas, los clones positivos fueron crecidos en medio líquido LB suplementado con antibiótico y guardados como glicerizados a -80 °C hasta su utilización.

### **5.3 Preparación de células electro-competentes de *A. tumefaciens***

Para el crecimiento de las cepas se utilizó LB más el antibiótico de selección de cada una de ellas. Para las cepas LBA4404 y EHA105 se empleó rifampicina a 20 µg/mL y para AGL-1 rifampicina a 20 µg/mL y carbenicilina a 75 µg/mL.

Se inoculó cada cepa en 5 mL de LB suplementado con antibióticos y se incubó toda la noche a 28 °C y 150 rpm. Al día siguiente, se inocularon 2 matraces de 300 mL del mismo medio con 1 mL del precultivo y se incubó a 28 °C con agitación a 150 rpm hasta que la  $A_{600}$  alcanzó un valor de 0,5. Se enfriaron los cultivos en hielo durante 15 min y se centrifugaron 15 min a 4500 rpm y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 mL de agua estéril fría, se volvieron a centrifugar las células a 4500 rpm y 4 °C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Se lavaron las células con 25 mL de glicerol al 10 % durante 1 h y fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min y a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 3 mL de glicerol al 10 % y se prepararon alícuotas de 100 µl en tubos de 1,5 mL previamente enfriados a -20 °C que se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación se descongeló en hielo un alícuota de las células electrocompetentes guardadas a -80 °C. A continuación, y en condiciones de frío, se les añadió el plásmido y se traspasó la mezcla a la cubeta de electroporación evitando la formación de burbujas. La electroporación se realizó con un aparato Gene Pulse II (Biorad) empleando las siguientes condiciones: Voltaje 2500 V; Capacitancia 25 µF; Resistencia 200 W. Inmediatamente después del pulso se añadió 450 µL de medio SOC (Sambrook, 1989) y se traspasó el contenido de la cubeta a un tubo de 1,5 mL que se incubó a 28 °C durante 1.5 horas a 200 rpm para la recuperación de las células. Una vez pasado este tiempo se sembró en placas con medio LC conteniendo los antibióticos de selección de cada cepa más la que posee el vector y se incubaron a 28 °C durante 2 días. Tras la comprobación por PCR de las colonias seleccionadas, los clones positivos fueron crecidos en medio líquido LC más antibióticos durante dos días y guardados como glicerizados a -80 °C hasta su utilización.

## **6. Secuenciación**

El protocolo de secuenciación empleado está basado en el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.* 1977), utilizando el kit "BigDye® terminator v3.1 Cycle sequencing" (Applied Biosystems), que incorpora en una única mezcla todos los componentes necesarios para la secuenciación, excepto el DNA y el oligonucleótido. La separación electroforética se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de ADN de la Universidad de Valencia (S.C.S.I.E, Valencia). Según la longitud del molde empleado se varió la cantidad del mismo en la reacción, para plásmido se utilizaron entre 20 y 60 ng y para fósido entre 100 y 150 ngr.

### **6.1 Análisis de secuencias**

Se utilizó el programa Seqtools 8.4 (<http://seqtools.dk>) para obtener las secuencias crudas desde los cromatogramas enviados desde el servicio de secuenciación. Estas secuencias fueron procesadas eliminando la parte de secuencia correspondiente al vector y los adaptadores antes de proceder a su análisis. Todo el procesamiento de secuencias y el análisis de agrupamientos fueron realizados con el mismo programa.

Para la identificación de ESTs con alta similitud con genes de hongo se utilizaron los algoritmos de búsqueda de homologías BlastX y BlastN (Altschul *et al.* 1997) frente a la base de datos no redundantes del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Aquellas secuencias que presentaron elevada similitud con secuencias fúngicas fueron putativamente asignadas como procedentes de *P. digitatum*, mientras que las que presentaban mayor similitud con secuencias de plantas fueron asignadas al fruto. La anotación de ontologías génicas de las ESTs se llevó a cabo con el programa Blast2go (Götz *et al.* 2008; <http://www.blast2go.de/>) asignándolas según el proceso biológico o la función molecular que desempeñan.

## **7. Construcción de vectores**

Se han realizado varias construcciones con diferentes genes de interés para transformar *P. digitatum* vía *A. tumefaciens* como se indica en el apartado 10 de Materiales y Métodos de esta Tesis siguiendo la técnica "USER Friendly cloning" (Frandsen *et al.* 2008) que permite en un único paso de clonación integrar los dos fragmentos de DNA requeridos para la recombinación homóloga flanqueando el marcador de resistencia presente en el vector receptor. Esta técnica ha sido utilizada para la obtención de 7 construcciones con las que llevar a cabo el reemplazamiento por recombinación homóloga de 6 genes diferentes (*pg1*, *pg2*, *pn1*, *ris1*, *pacC* y *ku80*) usando como vector el plásmido binario pRF-HU2 (Frandsen *et al.* 2008). Para el gen *pacC* se realizaron dos construcciones, una para la sobreexpresión de la proteína funcional y otra para el reemplazamiento del gen, mientras que para el resto de genes sólo se realizaron las construcciones necesarias para el reemplazamiento del gen y obtener transformantes deficientes en el mismo. Asimismo, se realizaron también dos

construcciones para la sobreexpresión de dos genes (*pacC* y *egfp*), usando el vector pRF-HUE mediante integración aleatoria en el genoma del hongo por recombinación no homóloga.

**7.1 Diseño de oligonucleótidos**

Las secuencias flanqueantes a cada uno de los genes que se pretendían eliminar fueron amplificadas usando 2 parejas de oligonucleótidos. La pareja O1-O2 para amplificar la región del promotor y la pareja A3-A4 para la región del terminador de todos los genes. En el caso de *pacC* se realizaron dos construcciones para obtener mutantes de delección. En la primera construcción se empleó aproximadamente 1 kb de región promotora y terminadora. Como no se obtuvo ningún mutante de delección se obtuvo una nueva construcción en la que se empleó aproximadamente 1.5 kb de las regiones promotoras y terminadoras. En la primera construcción se utilizaron las parejas de oligonucleótidos anteriormente expuestas y en la segunda se utilizaron las parejas D1-O2 y A3-D4 para las regiones del promotor y del terminador respectivamente. Además, en el caso del gen *pacC* se llevó a cabo una construcción para la expresión constitutiva de una forma activa de la proteína (PacC<sup>c</sup>), para lo cual se emplearon las parejas de cebadores C1-C2S para amplificar la región promotora y la pareja A3-D4 para la región terminadora, que fue común para ambas. Para la construcción de sobreexpresión de *pacC* sólo se utilizó la pareja de oligonucleótidos O3-C2S, que son los que amplifican la región codificante de la proteína funcional para su clonación a continuación del promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* presente en el vector pRF-HUE. Como molde se utilizó el DNA del fósido obtenido según se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos para cada uno de los genes.

Los oligonucleótidos específicos diseñados para cada uno de los genes incluyen una parte de la secuencia propia del gen más una extensión de 9 nucleótidos en el extremo 5' correspondiente a secuencia del vector que finaliza con una 2-deoxiuridina, O1 = 5'GGTCTTAAU, O2 = 5'GGCATTAAU, O3 = 5'GGACTTAAU, O4 = 5'GGGTTTAAU, A3 = 5'GGACTTAAU, A4 = 5'GGGTTTAAU. Estas extensiones de los oligonucleótidos aseguran la direccionalidad en las reacciones de clonación empleando los plásmidos de la serie pRF (Frandsen et al., 2008; Tabla 3).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones promotoras y terminadoras de cada uno de los genes empleadas para la obtención de las construcciones de delección. En el gen *pacC* también se incluyen los oligonucleótidos empleados para la expresión constitutiva y sobreexpresión.

Oligonucleótido	Secuencia
RP-O1	5'- GGTCTTAAU TACCCGGGGATCCCACGTACAACGA
RP-O2	5'- GGCATTAAU GCCAGGCGGTTGAACTTCCGAAAA
RP-A3	5'- GGACTTAAU GCGAAGCCGAAGGTGACATGCAACG
RP-A4	5'- GGGTTTAAU TCCCGAGGCATATTTTGC AACTGTGGA
PACC-O1	5'- GGTCTTAAU GGTGGTTACATATGTCCCAAGGTCA



## Materiales y Métodos

PACC-O2	5'- GGCATTAAU GATGCCAAGAAGCTTGGTCTGGAAT
PACC-O3	5'- GGACTTAAU GACGGAGAACCATACCCCTTCTA
PACC-O4	5'- GGGTTTAAU ATATCCTCGCTTACGGTCATAAGG
PACC-A3	5'- GGACTTAAU CATATCTCGGAGAGTCTGATTGACC
PACC-A4	5'- GGGTTTAAU TACTCAGGGACGTGCTCAGTTTTAC
PACC-C1	5'- GGTCTTAAU TTTTCTGGGCAAAGGCTCGGCTCCT
PACC-C2S	5'- GGGTTTAAU TTAGCGACGATCGTCGTGGTCATAC
PACC-D1	5'- GGTCTTAAU ACCTCCGCCGA ACTCCAGCGTGAAT
PACC-D4	5'- GGGTTTAAU GAAAATCCATCCAATCGCCCTCGCCCTA
PGI-O1	5'- GGTCTTAAU GCCCCACTGGTCGATCCTAACCTTCCA
PGI-O2	5'- GGCATTAAU TG GGGGTTGACGCTTGCATAACAGAGC
PGI-A3	5'- GGACTTAAU GCCAGCGATCAAATGGTGAACACCAAAC
PGI-A4	5'- GGGTTTAAU AAGCGTCTGCGTGGTGGTGTGCAGT
PGII-O1	5'- GGTCTTAAU T GCGTGGTCTGTGGGGTGGTCGTTT
PGII-O2	5'- GGCATTAAU TG GGTGCCGGTGTTCATCCAGTCA
PGII-A3	5'- GGACTTAAU TTTGACTCCTTGCTGGCCGGGCTTG
PGII-A4	5'- GGGTTTAAU TCCGCTCGTGAACAGGAGCACGTTG
PL-O1	5'- GGTCTTAAU TACACTATCCCAAGCCCCGGCGTA
PL-O2	5'- GGCATTAAU GGGCTTTGTTACCGCCATTGATCTCC
PL-A3	5'- GGACTTAAU TCGGGGCAATTGCTTCGCTACACCA
PL-A4	5'- GGGTTTAAU GCCGACCTAACTTTAGGGGCACCCAGTT
KU-O1	5'- GGTCTTAAU TTGAGGTCGCGTCGGTGTCTGAACA
KU-O2	5'- GGCATTAAU ACCACACCAACAGTGGCCGTCTTGC
KU-A3	5'- GGACTTAAU CGGAGGGAGCTGTGGTGGTTTGTGA
KU-A4	5'- GGGTTTAAU TGCCCGTCTTACTTCACCGCAATGG
EGFP-O3	5'- GGACTTAAU GGTGAGCAAAGGGCGAGGTGT
EGFP-O4	5'- GGGTTTAAU TTACTTGTACAGCTGGTCCATGCC

Además de los oligonucleótidos utilizados para obtener cada construcción también se emplearon los oligonucleótidos RF-1, RF-2 y RF-3 para verificar la correcta orientación de todas las construcciones (Tabla 4).

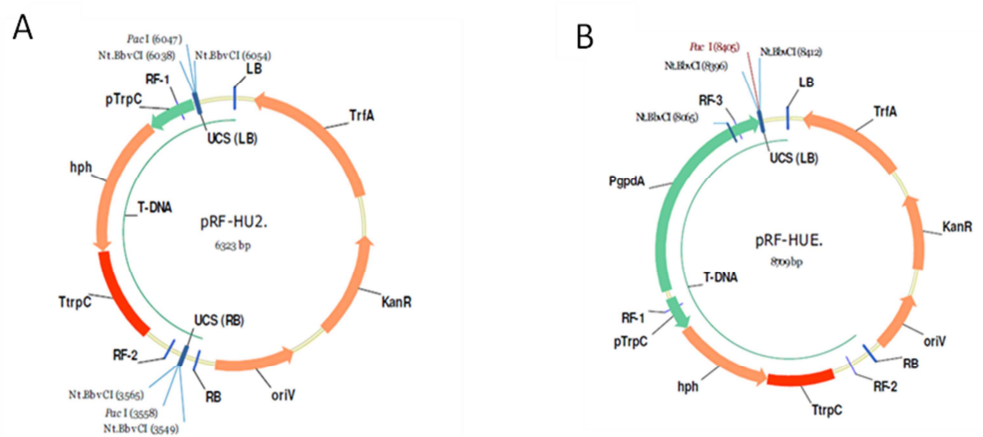
**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para verificar las construcciones.

Oligonucleótido	Secuencia
RF-1	5'- AAATTTGTGCTCACCGCTGGAC
RF-2	5'- TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG
RF-3	5'- TTGCGTCAGTCCAACATTGTTGCCA

## 7.2 Preparación de vectores

### 7.2.1 Linearización de los vectores

Los vectores pRF-HU2 y pRF-HUE (Figura 6) se encuentran como plásmido de bajo número de copias en *E. coli*. El protocolo requiere unos 10 µg de vector, por lo que se hace necesaria una extracción de DNA plasmídico a gran escala como se indica en el apartado 3.6.1 de Materiales y Métodos.



**Figura 6.** Representación esquemática de los vectores pRF-HU2 y pRF-HUE. (A) pRF-HU2, (B) pRF-HUE (Frandsen *et al.* 2008).

Una vez se obtuvo la cantidad suficiente de los vectores, el DNA se digirió con 70 unidades de la enzima de restricción PacI (New England Biolabs) incubando toda la noche a 37 °C en un volumen total de 300 µL. Al siguiente día se añadió 20 unidades más de PacI y 40 unidades de la enzima Nt.BbvCI (New England Biolabs), y se incubó durante 1 h a 37 °C. PacI es una

endonucleasa que produce extremos cohesivos dejando 2 pb libres y Nt.BbvCI, únicamente corta en una de las dos cadenas de DNA eliminando 7 pb más, por lo tanto, se genera en el vector extremos cohesivos compatibles con el fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos diseñados. Para verificar la digestión de los vectores se realizó un gel de electroforesis en gel de agarosa.

Una vez verificadas las digestiones, se procedió a la purificación de los plásmidos con el “High Pure PCR Product Purification kit” (Roche), resuspendiendo el DNA en un volumen final de 100 µL. Se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría usando un equipo Nanodrop (ND-1000 Thermo Scientific).

### **7.2.2 Reacción de clonación USER**

La técnica de clonación USER (uracil-specific excision reagent) Friendly (New England Biolabs) permite la clonación direccional de los productos de PCR, independientemente de que éste contenga sitios de restricción y de DNA ligasa.

Utilizando los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes se amplifican los fragmentos de interés para unirlos al vector correspondiente. Para la amplificación de regiones codificantes se empleó la DNA polimerasa PfuTurbo Hotstart (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante. Esta polimerasa posee actividad exonucleasa 3'-5' y puede amplificar fragmentos que contienen uracilo. Para la amplificación de regiones promotoras y terminadoras se empleó la DNA polimerasa EcoTaq (Ecogen) que no posee actividad exonucleasa 3'-5'. Los fragmentos amplificados fueron verificados mediante un gel de agarosa.

En un volumen final de 25 µL se añadió 150 ngr de cada uno de los fragmentos amplificados por PCR y 200 ngr del vector linearizado junto con 1 µL de la mezcla de la enzima USER, la reacción se incubó a 37 °C durante 20 min seguida de otros 20 min a 25 °C en el termociclador.

### **7.2.3 Transformación**

Una vez terminada la fusión de los fragmentos de DNA y el vector se utilizaron 10 µL de la mezcla para transformar *E. coli*. La transformación se hizo según el protocolo de choque térmico y no por electroporación, ya que ésta podría disociar los fragmentos unidos no covalentemente. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con kanamicina (25 µg/mL).

Al siguiente día se analizaron 10 colonias mediante PCR usando los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos del gen y los oligonucleótidos diseñados que se encuentran dentro del vector, como son RF-1, RF-2 y RF-3, cuya secuencia se describe en el apartado 7.1. Para la comprobación de los insertos en las construcciones realizadas con el vector pRF-HU2 se utilizaron los oligonucleótidos O1 de cada gen y el cebador RF-2 para el fragmento correspondiente a la región promotora y la combinación A4-RF1 para el

fragmento del terminador. Para la construcción en el vector pRF-HUE, en la que sólo se introduce un fragmento, se utilizó la combinación de oligonucleótidos O4-RF3.

Los clones positivos fueron crecidos en 10 mL de medio LB suplementado con 25 µg/mL de kanamicina e incubados a 37 °C. Se purificaron los plásmidos y se secuenciaron los sitios de inserción de los fragmentos introducidos empleando los oligonucleótidos RF-1, RF-2 y RF-3 para asegurarnos la correcta orientación de los insertos así como que los puntos de unión entre el vector y los fragmentos eran los correctos. Una vez seleccionado el plásmido correcto se introdujo en *A. tumefaciens* mediante electroporación para la posterior transformación de *P. digitatum*.

### **8. Construcción del plásmido pRF-HU2Fle**

Debido a la necesidad de tener un segundo marcador de selección para *P. digitatum* se hicieron pruebas de resistencia a fleomicina (Invivogen) en dos medios de crecimiento diferentes y a varias concentraciones del antibiótico. Se utilizó PDA e YPD (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 2 g/L glucosa, 2 g/L agar). Se probaron 4 concentraciones de fleomicina (100, 50, 25 y 10 µg/mL) y cantidades diferentes de conidios del aislado Pd1 de *P. digitatum* ( $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  conidios/mL).

Una vez comprobado que se podía utilizar fleomicina como marcador de selección para *P. digitatum* se procedió a introducir el gen de resistencia a fleomicina, obtenido del plásmido pUG66 (European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis. <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>), sustituyendo el casete de resistencia a higromicina presente en el plásmido pRF-HU2. En el plásmido pUG66 el gen de resistencia a fleomicina proviene del transposón Tn5 y su expresión está controlada por el promotor y terminador del gen *tef* (Translation Elongation Factor) de *Ashbya gossypii*.

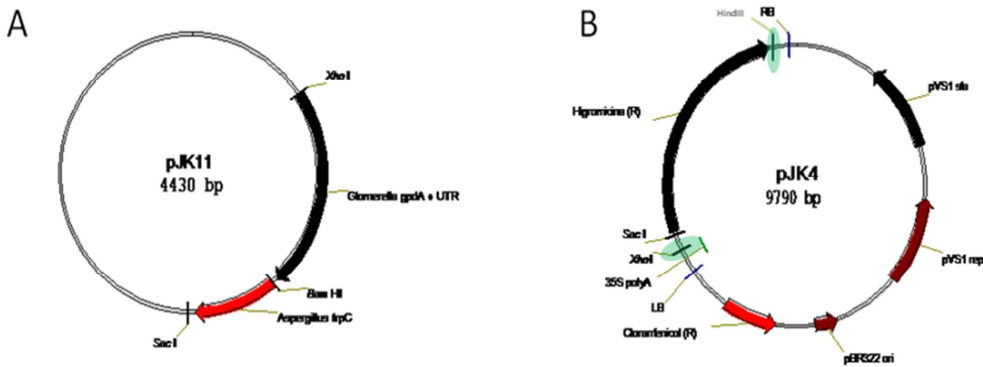
Para eliminar el casete de resistencia a higromicina del plásmido pRF-HU2 se digirió el mismo con las enzimas BamHI y ClaI. El casete de resistencia a fleomicina se amplificó con los oligonucleótidos Ble-A1 (TCAGCGGGCCCATCGTAGGTCTAGAGATCTGTTAGCT) y Ble-S1 (ACTAGTCGGGGGATCCGAAGTTATATTAAGGGTTCTG). Estos oligonucleótidos incluyen 15 nucleótidos en los extremos 5' que son idénticos a la secuencia del vector donde deben insertarse (marcados en rojo). El cebador Ble-A1 posee los 15 nucleótidos del vector pRF-HU2 donde corta ClaI más 23 nucleótidos del promotor del gen *tef* presente en el plásmido pUG66 y Ble-S1 posee 15 nucleótidos del vector pRF-HU2 donde corta BamHI más 23 nucleótidos del terminador del gen *tef* del plásmido pUG66.

Una vez digerido el vector se procedió a amplificar el fragmento de pUG66 que contiene el marcador de fleomicina con los oligonucleótidos Ble-A1 y Ble-S1 usando para ello la DNA polimerasa Pfu Turbo Hotstart (Stratagene) de alta fidelidad siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se purificó el fragmento amplificado con el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche) y se unió con el vector digerido empleando el "In-Fusion Dry-Down PCR Cloning kit" (Clontech) según las instrucciones del fabricante. El plásmido obtenido se empleó para obtener mutantes de *P. digitatum* deficientes en el gen *ku80* y resistentes a

fleomicina, de forma análoga a cómo se describe en el apartado 10 para la obtención de mutantes deficientes en *ku80* y resistentes a higromicina.

**9. Construcciones de RNA interferente**

Para la obtención de las construcciones para el silenciamiento génico mediante RNA interferente se utilizaron como base los vectores pJK11 y pJK4 (Fitzgerald, 2003) (Figura 7). Se han construido dos nuevos vectores partiendo como base del plásmido pJK4, a los que se les denominó pKMP1 y pKMP2. La necesidad de la creación de los plásmidos pKMP1 y pKMP2 es debida a que dentro del casete del gen de resistencia a higromicina del plásmido pJK4, la parte del terminador posee también parte del gen *ASS* (arginato succinato sintasa) de *B. cinerea*, lo que produce que, al igual que los fragmentos de las secuencias repetidas de los genes de interés, este gen que está muy conservado en diferentes hongos también vea reducida su expresión, produciendo mutantes auxótrofos que tendrán alterada su capacidad infectiva, por lo tanto, los resultados obtenidos no reflejarán la verdadera función de nuestros genes de interés.



**Figura 7.** Representación esquemática de los vectores utilizados para las construcciones de RNA interferente. (A) pJK11, (B) pJK4 (Fitzgerald, 2003). En color verde sobre el vector pJK4 se muestran los sitios de corte HindIII y XbaI.

Para la construcción del plásmido pKMP1 se diseñaron los oligonucleótidos PH-1 y PH-2 (Tabla 5) con los que se amplificó tanto el promotor como el gen de resistencia a higromicina desde el plásmido pJK4. Después de la purificación de los productos de amplificación, estos fueron digeridos con EcoRI y XbaI. Los oligonucleótidos T-GPD3 y T-GPD4 (Tabla 5) fueron diseñados para amplificar el terminador del gen *gpd* a partir de DNA genómico de *F. oxysporum*. El producto de la amplificación fue purificado y digerido con EcoRI y HindIII. Estos dos fragmentos fueron ligados en el plásmido pJK4, previamente digerido con HindIII y XbaI, creando pKMP1.

Para obtener el plásmido pKMP2 se aisló un fragmento de 1,2 Kb del plásmido pUG66 conteniendo el gen de resistencia a fleomicina y las secuencias control del mismo (promotor

y terminador) usando las enzimas de restricción HindIII y SacI. Este fragmento fue ligado en el plásmido pJK4 digerido con las mismas enzimas HindIII y SacI para eliminar el casete de higromicina, creando el nuevo plásmido pKMP2.

El plásmido pJK11 está diseñado para la construcción de las repeticiones invertidas de los genes diana. pJK11 contiene un fragmento de promotor del gen *gpdA* de *Glomerella cingulata* y un fragmento del terminador *trpC* de *A. nidulans*, separados por sitios únicos de restricción EcoRI y HindIII, donde se insertan las repeticiones invertidas. Los fragmentos de las secuencias repetidas "hairpin" se crean a partir de las regiones codificantes de los genes mediante PCR. Los oligonucleótidos son diseñados para crear un bucle en la hebra sentido. Tras la amplificación, el producto sentido es purificado y digerido con HindIII y BamHI. La región antisentido es purificada y digerida con EcoRI y BamHI. Los fragmentos sentido y antisentido aislados son entonces ligados en el plásmido pJK11 digerido con EcoRI y HindIII.

El fragmento de las secuencias "hairpin" junto con el fragmento de promotor del gen *gpdA* de *G. cingulata* y el fragmento del terminador *trpC* de *A. nidulans* son digeridos y ligados en el plásmido pJK4, que es un plásmido binario, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Este plásmido contiene el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección para los transformantes.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la construcción del plásmido pKMP1.

pKMP1	Secuencia Oligonucleótidos 5'-3'	Tm	Sitio de restricción
PH-1	GAGAGATCTAGAACCATCAAAGTCGTATAGCTACCAGT	56	XbaI
PH-2	GAGAGAGAATTCTTCGAGATCAACGTGGGCGG	56	EcoRI
T-GPD3	GAGAGAGAATTCGCGTAGAGCGCTCAAGAGGC	58	EcoRI
T-GPD4	GAGAGAAAGCTTCTATGGCCGAAAAGGGTTGCT	57	HindIII

## **10. Transformación de *P. digitatum* mediante *A. tumefaciens***

En esta Tesis se ha puesto a punto un método de transformación de *P. digitatum* usando *A. tumefaciens*. Se han utilizado tres cepas diferentes de *A. tumefaciens* que han sido descritas en la bibliografía cómo útiles para la transformación de otros hongos filamentosos. Las cepas utilizadas han sido LBA4404, EHA105 y AGL-1.

### **10.1 Transformación de *P. digitatum* mediada por *A. tumefaciens***

Una colonia individual de la cepa de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido de interés se inoculó en medio LC (Hooykaas, 1977) líquido conteniendo los antibióticos apropiados y se incubó a 28 °C y 200 rpm durante un día. Se centrifugó una alícuota de 1,5 mL del cultivo a

2400 × g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y tras un lavado con un volumen de medio de inducción IM (Hooykaas, 1979) las células se resuspendieron a una A<sub>600</sub> de 0,15 en medio de inducción (IM) suplementado con acetosiringona (AS) 200 μM. Este cultivo fue incubado a 28 °C y 200 rpm hasta que la A<sub>600</sub> alcanzó un valor entre 0,7 y 1,0. Los conidios de *P. digitatum* fueron obtenidos como se indica en el apartado 1.2.1 de Materiales y Métodos, pero antes de ser cuantificados fueron lavados dos veces con medio de inducción IM y ajustados a la concentración requerida con medio IM suplementado con AS.

A continuación, se mezcló un volumen de suspensión de conidios a la concentración requerida con un volumen de células de *A. tumefaciens*. Seguidamente, la mezcla fue sembrada sobre filtros de nitrocelulosa (0,45 μm de poro y 45 mm de diámetro) previamente colocados en placas conteniendo IM (con glucosa a 5 mM en vez de 10 mM) y tras una co-incubación a 24 °C durante 3-4 días, los filtros fueron transferidos a placas de PDA conteniendo higromicina (100 μgr/mL), para la selección de transformantes, y cefotaxima (200 μgr/mL), para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*. Los presuntos transformantes, que fueron visibles a partir de los 4-5 días de incubación, fueron traspasados a medio PDA con higromicina e incubados a 24 °C hasta que esporularon. Entonces se procedió a inocular los conidios con la ayuda de un palillo estéril en medio GPY líquido con higromicina con el fin de obtener más biomasa para la extracción de DNA. También se llevó a cabo la obtención de aislados monospóricos mediante siembra por triple estría en placas de PDA conteniendo higromicina (100 μgr/mL). Una vez crecidos y esporulados, estos aislados monospóricos fueron guardados a -80 °C como suspensión de conidios en glicerol al 25 %.

## **10.2 Estabilidad mitótica de los transformantes**

Para determinar la estabilidad mitótica del T-DNA insertado en los transformantes, varios presuntos transformantes fueron sembrados en placas de PDA durante 8 generaciones sucesivas (7 días por cada generación) en ausencia de higromicina, y tras estos pases una dilución de los transformantes fueron sembrados en placas tanto de PDA con higromicina (100 μgr/mL) como en PDA sin antibiótico e incubados a 24 °C. La estabilidad mitótica se determinó como la proporción de colonias que crecen en presencia de higromicina respecto a las que lo hacen en medio no selectivo.

## **11. Construcción de una genoteca sustractiva de cDNA enriquecida en genes de *P. digitatum* inducidos durante la infección de frutos cítricos.**

### **11.1 Hibridación sustractiva mediada por PCR supresiva (SSH)**

Tanto la síntesis de cDNA como el procedimiento del SSH (Diatchenko *et al.* 1996) fueron llevados a cabo usando el *kit* "PCR-Select™ cDNA Subtraction" (Clontech, Palo Alto, CA, USA) conforme al protocolo que indica el fabricante. Se usó una mezcla de RNAs de fruto herido e inoculado con agua a las 72 h tras la inoculación y de hongo crecido en medio PDB durante 72 h como muestra "driver" y RNA de tejido de fruto infectado con *P. digitatum* 72 h tras la inoculación de los frutos como muestra "tester". Un microgramo de RNA poly(A)<sup>+</sup> de las

muestras de “tester” y “driver” fueron utilizados para la síntesis de cDNA. Las muestras de cDNA de “tester” y “driver” fueron primero digeridas con la enzima de restricción RsaI, que produce fragmentos de cDNA con extremos romos. Los fragmentos de cDNA de la muestra “tester” se dividieron en dos alícuotas iguales y cada una se ligó con un adaptador diferente, resultando en dos poblaciones “tester” de cDNA. Una pequeña cantidad de cada una de estas dos poblaciones se hibridó con un exceso de “driver”. Las dos muestras de esta primera hibridación fueron entonces combinadas entre sí añadiendo una cantidad extra de cDNA “driver”. Se realizó una PCR inicial usando un único cebador que está presente en el extremo 5' de los dos adaptadores. A continuación, se llevó a cabo una segunda PCR usando como cebadores dos oligonucleótidos “nested” presentes en el extremo 3' de los adaptadores. Los fragmentos de cDNA sustraídos fueron purificados usando el kit comercial “High Pure PCR Product Purification kit” (Roche, Barcelona, Spain) como indica el proveedor y fueron entonces ligados al vector de clonación pCRII (Invitrogen). Una alícuota de la mezcla de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) por electroporación. La selección de clones se realizó en placas de LB suplementado con carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) y 80  $\mu$ L de X-Gal (20 mg/mL).

Los plásmidos fueron purificados con el kit “GeneElute Plasmid Miniprep” (Sigma, St. Louis, MO, USA) y secuenciados con el primer SP6 (5' GATTTAGGTGACACTATAG 3') y el kit “BigDye terminator” (Applied Biosystems, USA) por el servicio de secuenciación del IBMCP (UPV-CSIC, Valencia, Spain). Se secuenciaron un total de 328 clones.

### **11.2 Elaboración e hibridación de una macromatriz de cDNA**

Partiendo de la genoteca sustraída previamente creada, denominada PDS, se realizó un análisis de expresión génica mediante el empleo de un macromatriz de cDNA. Esta genoteca está enriquecida en genes de *P. digitatum* que se expresan más abundantemente durante la infección de frutos cítricos que durante el crecimiento del hongo en medio de cultivo. A partir de esta genoteca se amplificó por PCR el inserto presente en 1440 clones seleccionados al azar. Los productos de PCR fueron impresos en una macromatriz de nailon formada por 16 placas de 96 clones, distribuidos en 12 columnas y 8 filas, por el Laboratorio de Chips de DNA de la Universitat de València. En la macromatriz se añadieron además 96 controles de amplificación, impresión y expresión génica conocida. Una de las 16 placas contenía todos los controles para su distribución homogénea por toda la matriz. Cada macromatriz conteniendo 1536 puntos fue hibridada con muestras de cDNA marcadas con <sup>33</sup>P derivadas de RNA total de tejido de fruto infectado a los 3 días después de la inoculación y *P. digitatum* crecido durante 3 días en PDB. Se hibridaron 3 réplicas biológicas independientes.

Para la hibridación de las macromatrices se sintetizó cDNA a partir de 20  $\mu$ g de RNA total por transcripción reversa. Se añadió al RNA 1,5  $\mu$ L del cebador “anchored” oligo (dT) 20 (2,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Invitrogen), se incubó a 70 °C durante 5 min, y se transfirió a hielo. Posteriormente se añadió 6  $\mu$ L de tampón 5X de primera hebra, 1,5  $\mu$ L de ditiotreititol (DTT) 0,1 M (Invitrogen), 1,5  $\mu$ L de una mezcla de dNTPs (16 mM cada dATP, dGTP, dTTP y 100  $\mu$ M el dCTP) (Sigma),



4,5  $\mu\text{L}$  de [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dCTP (10 mCi/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasas (10 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen) y 2  $\mu\text{L}$  de Superscript III reverse transcriptase (400 U) (Invitrogen). La incubación tuvo lugar durante 120 min a 50 °C y luego se detuvo la reacción mediante incubación a 70 °C durante 15 min. El RNA se degradó mediante lisis alcalina añadiendo 3,5  $\mu\text{L}$  de NaOH 3 N e incubando a 70 °C durante 15 min. El pH se neutralizó con 10  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y 10,5  $\mu\text{L}$  de HCl 1N en un volumen final de 54  $\mu\text{L}$ . La eliminación del [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dCTP no incorporado se realizó mediante el *kit* de purificación “Microspin S-300HR Columns” (Amersham). El  $^{33}\text{P}$  incorporado en las muestras fue cuantificado con un contador de centelleo líquido. La concentración final de cada cDNA fue ajustada a  $3 \times 10^6$  cpm/mL con TE.

La hibridación de la macromatriz y la posterior eliminación de la sonda radiactiva para reutilizar la membrana se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Alberola *et al.* (2004). Después de la hibridación, las membranas se lavaron una vez con 50 mL de 2 X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a 65 °C, y posteriormente dos veces con 50 mL de 0,2 X SSC, SDS 0,1 % (p/v) durante 30 min a 65 °C. Tras el último lavado los filtros se envolvieron en film de plástico transparente y se expusieron 2 días con una pantalla “BAS MP 2040 Imaging Plate” (Fuji Photo Film Co., LTD). El densitometrado de la imagen se realizó con un equipo FLA-3000 (Fuji Photo Film Co., LTD).

### **11.3 Análisis de las hibridaciones de las macromatrices**

Para la cuantificación de la señales de hibridación de las macromatrices se utilizó el programa ArrayVision 7,0 (Imaging Research, Inc., GE Healthcare Europe, Barcelona, Spain). La intensidad de la señal de cada punto fue estimada como la densidad de ARM (Artifact Removed Median) una vez sustraído el ruido de fondo. Solamente los valores superiores a 1,3 veces el ruido de fondo local y que presentasen al menos señal de hibridación en 2 de las 3 réplicas fueron tomados como medidas válidas. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa ArrayStat (Imaging Research, Inc.). La normalización se llevó a cabo entre las diferentes condiciones usando la mediana global de los valores. Para identificar qué clones de cDNA presentan expresión diferencial entre las condiciones analizadas se utilizó el “z-test” para dos condiciones independientes. Este test nos da como resultado el estadístico “valor-Z” que se calcula como la diferencia entre las medidas dividida por el error estándar. Se utilizó la corrección de falsos positivos (FDR) al 5 % (valor nominal alfa de 0,05). Esto implica que hay una probabilidad del 5 % de que clones que se asignen como diferenciales, realmente no lo sean (Benjamini y Hochberg, 2000). Este tipo de corrección permite abordar el problema de las comparaciones múltiples de un modo diferente a las técnicas Bonferroni (Bland y Altman, 1995). Es un método menos restrictivo, y por lo tanto permite detectar mayor cantidad de diferencias biológicas dentro de los datos.

## **12. Construcción de una genoteca de DNA genómico de *P. digitatum***

Para la construcción de la genoteca se utilizó el “CopyControl™ HTP Fosmid Library Production kit” (EPICENTRE Biotechnologies), que permite clonar fragmentos de DNA de aproximadamente 40 kb en el fósido pCC2FOS.

En primer lugar se procedió a fragmentar el DNA para obtener una distribución de fragmentos de alrededor de 40 kb, ya que éste es el tamaño óptimo que admite el fósido empleado. Si los fragmentos son mayores el fósido resultante no es empaquetado eficazmente, y si son menores se corre el riesgo de obtener concatémeros. Para cizallar el DNA se empleó una punta de micropipeta de 200 µL y se pipeteó el DNA 75 veces.

Para purificar los fragmentos de DNA del tamaño deseado el DNA cizallado se resolvió en un gel de agarosa al 1 % (SeaKem gold Agarose, Cambrex) mediante electroforesis en campo pulsante en presencia de tampón 0,5 X TBE y empleando el equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron 150 µg de DNA y se realizó la electroforesis con las siguientes condiciones: temperatura de 14 °C, velocidad de 6 V/cm, ángulo de 120 °, con un tiempo de variación de rampa de 10-40 s. La electroforesis duró 16 h. Como marcadores de tamaño molecular se empleó DNA del fago lambda linealizado, que tiene 48,5 kb, y el fósido control presente en el kit, que tiene un tamaño de 36 kb.

Se cortó el trozo de gel situado entre los dos marcadores y se incubó a 70 °C durante 10-15 min para disolver la agarosa. A continuación, se añadió 2 µL de la enzima GELasa 50x del kit por cada 100 µL de muestra y se incubó a 45 °C durante 3 h. La enzima se inactivó mediante incubación a 70 °C durante 10 min. Después de enfriar 5 min en hielo se centrifugó 20 min a 9500 rpm. El DNA se precipitó añadiendo 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol 100 %. Tras incubar 40 min a -80 °C se centrifugó 20 min a 9500 rpm. El precipitado se lavó dos veces con 350 µL etanol frío al 70 %. Finalmente el DNA se resuspendió con 45 µL de TE.

A continuación se procedió a la reparación de los extremos de los fragmentos de DNA para dejarlos romos utilizando los componentes proporcionados en el kit. Tras fenolizar y precipitar de nuevo el DNA, se cuantificó el mismo con el fluoróforo picogreen. Finalmente, se procedió a ligar 0,25 µg de DNA genómico con 0,5 µg del fósido linealizado pCC2FOS suministrado en el kit en un volumen de 10 µL. La mezcla se incubó 3 h a temperatura ambiente y luego se inactivó la DNA ligasa incubando 10 min a 70 °C.

Para el empaquetamiento de los fósidos resultantes de la ligación se empleó la cepa de *E. coli* EPI300 suministrada con el kit y el extracto de empaquetamiento “MaxPlax Lambda Packaging Extracts” (Epicentre Biotechnologies) siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez terminado el empaquetamiento se añadió 150 µL de tampón PDB (Phage Dilution Buffer) y 5 µL de cloroformo, para evitar el crecimiento microbiano, y se guardó a 4 °C. Una alícuota de 10 µL de los fósidos empaquetados se empleó para transfectar la cepa de *E. coli* EPI300. Finalmente se sembraron distintas diluciones en placas con medio LB suplementado

con cloranfenicol a 12,5 µg/mL, que se incubaron toda la noche a 37 °C con el fin de titular la genoteca. Una vez titulada se repitió el procedimiento con una dilución apropiada para obtener aproximadamente 500 clones por placa. Las colonias de cada placa se recogieron con 3 mL de glicerol al 20 % y se guardaron a -80 °C.

Para la comprobación de la genoteca se purificaron los fósmidos de 5 clones elegidos al azar según se describe en el apartado 3.7.2. Se digirieron las muestras de DNA con la enzima de restricción BamHI. Esta enzima corta a ambos lados del sitio de clonación del fósrido. La estimación del tamaño del fragmento de DNA insertado en cada fósrido se llevó a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,6 % utilizando como marcadores de tamaño DNA lineal del fago lambda, DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción HindIII y el patrón de tamaños “1 kb plus DNA ladder” (Invitrogen). Los fósridos analizados deben presentar una banda común correspondiente al fósrido y la suma del resto de bandas debería estar comprendida entre 35 y 50 kb.

### **13. Secuenciación de genes de interés desde la genoteca de DNA**

A partir de 20 de los tubos de la genoteca se procedió a la inducción de la multiplicación del fósrido, ya que éste se encuentra en copia única dentro de cada célula. Para ello, se inoculó 1,5 mL de un cultivo de 12 h en 10 mL de LB suplementado con cloranfenicol (12,5 µg/mL) y con 10 µL de la solución de Inducción CopyControl 1000X del kit. Siguiendo las instrucciones del fabricante se dejó 5 h a 37 °C en agitación y manteniendo una buena aireación de los cultivos. A continuación se centrifugaron las células y se extrajo el DNA por el método de ebullición como se describe en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos.

#### **13.1 Cribado de la genoteca**

Una vez obtenido el DNA de los clones presentes en los veinte tubos se procedió a diseñar oligonucleótidos para cada uno de los genes de interés para poder hacer el cribado de la genoteca. Partiendo de la secuencia obtenida de los clones de la genoteca sustractiva se diseñaron oligonucleótidos para los genes que codifican putativamente una endoglucanasa (*egl1*, PDIP\_65210), una proteína Rieske (*ris1*, PDIP\_10140). De la genoteca sustractiva también se identificaron dos genes que codifican poligalacturonasas y una pectin liasa, cuya secuencia era idéntica a las de otros clones obtenidos anteriormente en el laboratorio en la generación de otras genotecas. Como estos últimos poseían una secuencia mayor, se emplearon estos últimos clones para el diseño de los oligonucleótidos. Para el gen *pg1* se empleó la secuencia del clon C06016G09, para el gen *pg2* el clon C34110E09 y para el gen *pn1* el clon C34104G01 (Tabla 6).

El gen *ku80* no fue aislado de la genoteca sustractiva. Para la clonación del mismo se diseñaron oligonucleótidos degenerados basados en la comparación de las secuencias de las proteínas Ku80 de los hongos filamentosos más cercanos a *P. digitatum* que poseen el genoma secuenciado, como son *A. fumigatus*, *A. oryzae* y *P. chrysogenum*. Para el gen *pacC* se diseñaron los oligonucleótidos basándonos en una secuencia obtenida previamente en el

laboratorio que se obtuvo de la misma manera que con el gen *ku80*, amplificando parte del gen con oligonucleótidos degenerados.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados para el cribado de cada uno de los genes.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)
<i>egl1</i>	A1	CGAAGTAAATCGAGAAGAAAG	21
	S1	GTCAAGCAGAACCCATTTC	18
<i>ku80</i>	A1	TCCARAGGWGGRAAMCGATA	20
	S1	GARTGGGYCATGSARTATGT	20
<i>pg1</i>	A1	CGATGTTGGACAGCTTGA	18
	S1	AACTCTGGCTCGAACATC	18
<i>pg2</i>	A1	CTCGGCACACAGAATGTA	18
	S1	CGAGAACTGCAACATCAA	18
<i>pnl1</i>	A1	TAGTGCTGACGACCAATG	18
	S1	CGAGGAGCTGGTCTCTTA	18
<i>pacc</i>	A1	TGAGAGCCACCAGGGCTGTA	20
	S1	AAGACCCATGCGGACGACTC	20
<i>ris1</i>	A1	GTTCCCTTGTCGAAGTTGC	18
	S1	GGAAATTCCCAAATCCTC	18

Una vez diseñados todos los oligonucleótidos se procedió a hacer una PCR con los mismos usando como molde el DNA obtenido de cada uno de los 20 tubos, en los que cada uno posee aproximadamente unos 500 clones. Al visualizar los resultados en geles de agarosa al 1 % se eligió un tubo que fuese positivo. Se inoculó entonces 5 µL del stock de -80 °C del tubo positivo para cada uno de los genes en 1 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol (12,5 µg/mL). De este cultivo se sembraron diluciones seriadas en placas de LB con cloranfenicol (12,5 µg/mL), que se incubaron a 37 °C hasta el día siguiente. De una dilución apropiada se seleccionaron 400 clones que se distribuyeron en 20 grupos de 20 clones cada uno resuspendiéndolos en 100 µL de agua estéril. Se realizó una nueva PCR con los mismos oligonucleótidos partiendo ahora de colonias directamente como molde. De estos 20 grupos se seleccionó uno de los tubos positivos y se realizó la misma operación. En una tercera ronda se resuspendieron 20 colonias individuales en 20 tubos con 10 µL de agua estéril, hasta identificar un clon individual positivo.

Una vez obtenido un clon positivo para cada uno de los genes se procedió a realizar una extracción de DNA a gran escala mediante lisis alcalina para obtener el fósido como se describe en el apartado 3.7.1 de Materiales y Métodos.

### **13.2 Obtención de secuencias de los genes**

Una vez se obtuvieron los fósidos conteniendo presuntamente cada uno de los genes se hizo una comprobación antes de empezar la secuenciación propiamente dicha. Se diseñaron 2 oligonucleótidos, pCC2-A1 (5' CAG GAA ACA GCC TAG GAA 3') y pCC2-S1 (5' GTA CAA CGA CAC CTA GAC 3'), que se encuentran flanqueando el sitio de inserción del DNA de *P. digitatum* dentro de fósido para poder secuenciar los extremos del mismo y comprobar

que el gen de interés no se encuentra interrumpido en alguno de los extremos del inserto. Utilizamos el kit “BigDye terminator” (Applied Biosystems, USA) para secuenciar los fragmentos en el servicio de secuenciación de ADN y Proteínas de la Universidad de Valencia (S.C.S.I.E, Valencia).

Una vez se verificó que los genes de interés estaban completos dentro del fósido se procedió a secuenciar los genes, para ello se utilizaron los mismos oligonucleótidos utilizados en el cribado de la genoteca y el kit “BigDye terminator”. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron nuevos oligonucleótidos en zonas seguras según los cromatogramas obtenidos y así se fue secuenciando todo el gen completo en ambas cadenas, incluyendo aproximadamente 1,5 kb de promotor y de terminador. Todos los oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los genes aparecen indicados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los genes.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (pb)</b>
PacC-S6	AATGTCCGAAC TAAGAACGA	20
PacC-S7	GTGCCTGAATATCAGCAAAT	20
PacC-S8	CTTGCATATCTCGGAGAGTC	20
PacC-S9	TTCCTTCCTCGCATTGTAT	19
PacC-S10	ACTTTTTCGAAGTTGGATCA	20
PacC-S11	TCTTTCTGCTTCTTTTCAGG	20
PacC-S12	ATGTGCCACTTAAACCTCAC	20
PacC-S13	CTTGAATGTTTGGAGTTGGT	20
PacC-A7	GTGAGGTTTAAGTGGCACA	19
PacC-A8	ATCATGTCAGGATGCTTCA	19
PacC-A9	ATGCCTAGAGAGCCAAAAA	19
PacC-A12	TCGTTCTTAGTTCGGACATT	20
PacC-A13	CACGCAAGACAAATTTAACA	20
PacC-A14	TAGAATCGAGACCGCTAGAA	20
PacC-A15	GTGTATGACTGTGCGCTAGA	20
PacC-A16	ACCTGAGGTGTTCCGATAG	19
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (pb)</b>
PGI-S2	TGGCTATCAACTCTGGCT	18
PGI-S3	TCACTCCTCCATCTTCTCAC	20
PGI-S4	TGGATTGATCTTGTC AATGG	20
PGI-S5	GAGTTCCGATGGTTCATGT	19
PGI-S6	AGTAACTCAGGGGGATGTG	19
PGI-S7	AAGCTCGATGGAATAGCTT	19
PGI-S8	AAAGAAGAAGCCCAAGTTCT	20
PGI-A1	CGATGTTGGACAGCTTGA	18
PGI-A2	CGTAATCCTGCTCGATGA	18

PGI-A3	CGCTCAACGAGATCAGTAA	19
PGI-A4	GTGTCCATCCACAGGTTAAG	20
PGI-A5	GAGCAAGTCTTCTGGAAAAA	20
PGI-A6	GTGCTGTCATGTACTCATCG	20
PGI-A7	CCCAGTAAAAGGACATGC	18
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (pb)</b>
PGII-S1	CGAGAACTGCAACATCAA	18
PGII-S2	CTGGGATTCTGACACGTTAT	20
PGII-S3	GATTCTTGACCGTAGGTCTG	20
PGII-S4	ATGCTATTGGTTCTTTCCTC	20
PGII-S5	CCAGGAAAAATAAGTGGAGA	20
PGII-S6	TCTGCATACAACCGAACAT	19
PGII-A1	CTCGGCACACAGAATGTA	18
PGII-A2	CCTTCGAAGATGACCTATTG	20
PGII-A3	GAAAAAGGACAAGCAATCTG	20
PGII-A4	CCACATATCGACCTTTGTCT	20
PGII-A5	CCCTTTTTCTTCCAGTCTTT	20
PGII-A6	TCCCTCCGTAAACTAAACAA	20
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (pb)</b>
PL-S1	CGAGGAGCTGGTCTCTTA	18
PL-S2	AACTTCATCAACGGTGAATC	20
PL-S3	GCAAAAACAGATGCACTTC	19
PL-S4	AACCTGGCACAAGTAAACC	19
PL-S5	CTGTGTACCCTACCACCAAC	20
PL-S6	CAAGATAGAACCCACAACCT	21
PL-S7	AAACGTCTCAACGGCTAAT	19
PL-S8	TCGAAACTCAACAACCTCTG	20
PL-A1	TAGTGCTGACGACCAATG	18
PL-A1B	GTTGTGCTCCAGTAGTTGT	20
PL-A2	TGTCGGTGAAGTCGAAACTA	20
PL-A3	CCAATTAACGTGCAAGATTC	20
PL-A4	CATCAGTATGCCACAAAAAG	20
PL-A5	TCAATTAATACGGGGCTAGA	20
PL-A6	TGCGGAGTATACGGAGTAGT	20
PL-A7	CATGAGAAGGCGTTGAAT	18
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (pb)</b>
RP-S1	GGAAATTCCTCAAATCCTC	18
RP-S1B	GAATGTTACCACTGCCCTAC	20
RP-S2	ACCATATTGCGTCTCTTCAT	20
RP-S3	AACACGGAAACCCTCAAG	18

RP-S4	AGGCGATTTAAGTTGGGTA	19
RP-S5	GAAGAACATCGTTGGGATT	19
RP-S6	GAGATTGAGGATTCGCATAG	20
RP-S7	TGCATCATGGTACACTTCAC	20
RP-A1	GTTCCCTGTGCGAAGTTGC	18
RP-A1B	TTCTGTGCGTTGTTACAGAG	20
RP-A2	GTATCGACAAGCGAGGATT	19
RP-A3	CAAGCCCTAATTTTCGATCT	20
RP-A4	CCCGTGCTACATCTTTAATC	20
RP-A5	TTAACAACCACACCAGTATCC	21
RP-A6	TCTTGTGGACCTGTTCTTTC	20
RP-A7	GAGAGAGAGCTCCGGAGT	19
Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)
KU-S2	GGAGTATGACACAGCAATCA	20
KU-S3	GACGAGTCATTCTCACCATT	20
KU-S4	TGGTAGGAGGTTGATTATGG	20
KU-S5	GTCTTCTGCGAGAGGTAGC	20
KU-S6	GTATCTGATCAGCACGGTTC	20
KU-S7	AAATGTGCAGAAGGGCTAT	19
KU-S8	GAGGGGAAGAAGTGGATATAA	21
KU-S9B	AAGAGGGTGTTAAGGTGGTT	20
KU-S10	CGGACATATCAGATCACAGA	20
KU-A2	AAAACATTCAGGACAGCTTG	20
KU-A3	TATTTCCAATTGCGGTTTAG	20
KU-A4	CTCACTCCAAGGAGATGCT	20
KU-A5	ATTGCCAGCAACAATCTC	18
KU-A6	GAGGGCAGTAAAAGTGAAG	19
KU-A7	TCAGTACCTTTGCACTGAGTC	21
KU-A8	CTCGCCTTTCTTAACATCTG	20
KU-A9	CTCTGGCGTTAAACAAAGTC	20
KU-A10	GGATTGCATTCTCGGTAGAT	20

#### **14. PCR en tiempo real para la cuantificación del número de copias de DNA**

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias obtenidas para cada uno de los genes de interés en la región promotora de los mismos. Como referencia se empleó el gen de *P. digitatum* que codifica la *beta-tubulina* a partir de la secuencia completa del aislado Pd1 de *P. digitatum* que se encuentra en la base de datos del NCBI (GU124566.1). Se estableció una longitud media de unos 25 pb para los oligonucleótidos y de un máximo de aproximadamente 200 pb para el amplicón, así como un porcentaje mínimo de GC del 50 % y

una temperatura de fusión próxima a 65 °C. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados así como la longitud del amplicón se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de PCR en tiempo real para cada uno de los genes ensayados.

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Longitud del amplicón (pb)
KU-Pr-S	ATATCACGCGTCTGCCTGTTGTCT	24	95
KU-Pr-AS	CTGTAGCTTCTTTCTCCGCCATGA	24	
PL-Pr-S	CACAACATAGGGCGACCTAATCC	23	148
PL-Pr-AS	CCATAGGGAGTAGTGTGACGTGTTCC	26	
PGI-Pr-S	CGGACGGAGTAGATCTCACAAC	23	112
PGI-Pr-AS	CCTGCGCTAACATCCTCATGAAAC	24	
PGII-Pr-S	CCTCGTGGTGCTGTACCTTCTC	23	85
PGII-Pr-AS	TCAGGGTAATGGTCGAGCAAGC	23	
RP-Pr-S	CCACCACAGCACTACAATCCGTACT	25	106
RP-Pr-AS	CCGAGTAGAGTTGGGTTTGACA	23	
beta-tub PD1G1	CGATGGCGATGGACAGTAAAGTTT	23	148
beta-tub PD1G2	TTGGTTCGTGGTCGTTGTACTION	24	

Se obtuvieron curvas de calibrado para cada una de las parejas de oligonucleótidos con la finalidad de obtener su eficiencia. Como molde se utilizó una muestra formada por una mezcla de los DNAs genómicos de cada una de las extracciones de los transformantes del ensayo ajustados a una misma concentración. Para la recta patrón se analizaron 8 puntos, realizando diluciones seriadas 1:2 partiendo de 80 ngr de la mezcla de DNAs genómicos. Cada dilución se ensayó por duplicado. La curva estándar se representó interpolando el valor Cp obtenido en cada caso en ordenadas y el logaritmo de la concentración de DNA en abscisas y se obtuvo la eficiencia (E) de cada pareja de oligonucleótidos según la fórmula:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{a}\right)}, \text{ donde "a" es la pendiente de la recta.}$$

#### **14.1 Reacción de PCR en tiempo real**

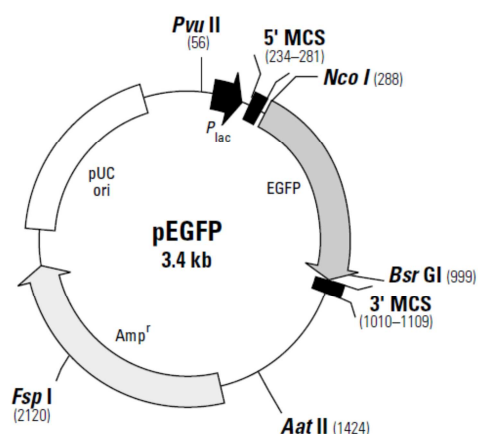
La concentración de DNA de las muestras estudiadas se determinó mediante espectrofotometría usando un equipo Nanodrop (ND-1000 Thermo Scientific). La cuantificación del número de copias de cada gen se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real con un termociclador LightCycler 2.0 de Roche (Penzberg, Alemania) y el software LigthCycler 4.0 para el registro de los datos. En cada reacción se utilizó 10 ngr de DNA de cada muestra y los oligonucleótidos específicos de cada gen. El volumen total de la reacción fue de 10 µL y consistió en 2 µL de muestra, 4,9 µL de agua, 2 µL de Master Mix (LC FastStar DNA MasterPLUS SYBR Green I, Roche), 0,5 µL de cada uno de los oligonucleótidos (10 µM) y 0,2 µL de cloruro de magnesio (50 mM). Las condiciones de reacción fueron 95 °C



10 min (desnaturalización), 35 ciclos de amplificación a 95/56/72 °C durante 20/20/20 s, respectivamente.

### **15. Microscopía de fluorescencia**

Una vez se desarrolló el sistema de transformación de *P. digitatum* usando *A. tumefaciens*, se transformó el aislado Pd1 de *P. digitatum* con dos vectores que contienen dos variantes de la proteína fluorescente GFP. La versión eGFP posee una doble sustitución, en el aminoácido 64 cambia una Phe por una Leu y en el 65 una Ser por Thr, respecto la proteína GFP original. El gen *egfp* fue obtenido por PCR a partir del plásmido pEGFP C3 (Invitrogen, cedido por el Dr. J.F. Marcos, IATA-CSIC), cuyo mapa físico se muestra en la Figura 8, y fue clonado en el plásmido pRF-HUE bajo el control de un promotor fuerte como se indica en el punto 7 de Materiales y Métodos de esta Tesis. La otra variante usada fue sGFP, la cual sólo posee un cambio en el aminoácido 65, que cambia Ser por Thr. Esta segunda variante está incluida en el plásmido binario pCAMBgfp (Figura 9), cedido amablemente por la Dra. Anne Osbourn (John Innes Center, UK) que ya había sido probado con éxito en otro hongo fitopatógeno como es *M. grisea* en arroz (Sesma y Osbourn, 2004).



**Figura 8.** Representación esquemática del vector pEGFP.

Los transformantes de *P. digitatum* obtenidos con cada uno de los plásmidos fueron cultivados en placas de PDA con higromicina (100 µg/mL). Se empleó micelio de estas placas, que se lavó y se resuspendió en una solución de glicerol al 20 %. La fluorescencia fue visualizada usando un microscopio de fluorescencia Eclipse 90i (Nikon) equipado con un filtro FITC B-2E/C (excitación a 450-490 nm y emisión a 515-565 nm).

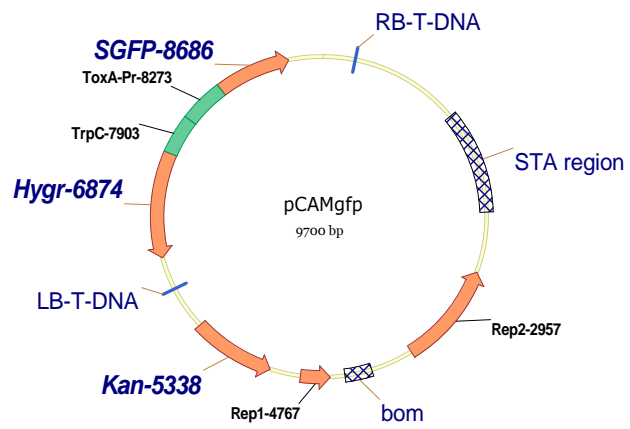


Figura 9. Representación esquemática del vector pCAMgfp (Sesma y Osbourn, 2004).

**RESULTADOS**

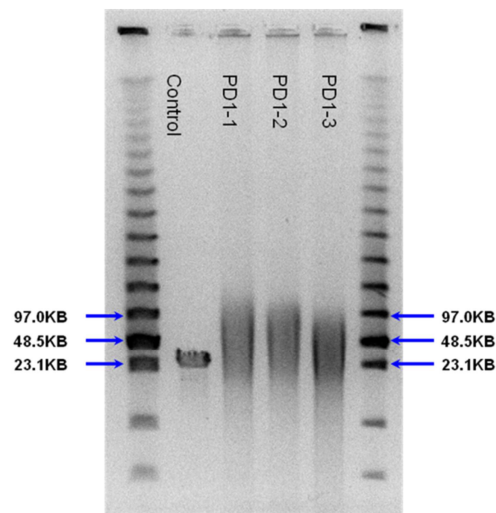
---

## **1. Herramientas genómicas**

Como se ha comentado en la Introducción, el empleo de herramientas moleculares y genómicas ha permitido dar un salto cualitativo en el estudio de los mecanismos de patogenicidad. Con el fin de dilucidar el papel que desempeñan en patogénesis los genes aislados en la genoteca PDS es necesario disponer de unas herramientas genómicas, que en el caso de *P. digitatum* no están desarrolladas, por lo que una parte importante del trabajo realizado en esta Tesis se ha centrado en el desarrollo de tales herramientas.

### **1.1 Construcción de una genoteca de DNA genómico de *P. digitatum***

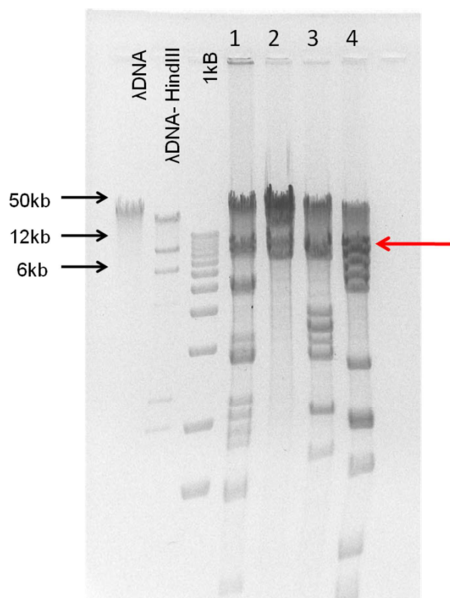
El DNA genómico de *P. digitatum* utilizado para la obtención de la genoteca se obtuvo como se indica en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. Mediante electroforesis en campo pulsante se comprobó que la distribución de tamaños del DNA purificado abarcaba desde 20 hasta 100 kb, centrada alrededor de 50 kb (Figura 10). Se procedió a la reparación de extremos y se ligaron 0,25 µg de DNA genómico con el fósido linealizado pCC2FOS del kit. Tras el empaquetamiento en fagos T1, éstos se usaron para transfectar la librería en la cepa de *E. coli* EPI300. Se obtuvieron 41 placas con una media de 500 colonias por cada una de ellas. Por lo tanto, la genoteca, que se denominó PD1G, está compuesta por aproximadamente 20000 colonias.



**Figura 10.** Distribución de tamaños de 3 muestras de DNA genómico de *P. digitatum* mediante electroforesis en campo pulsante. Como controles se utilizaron el fósido comercial proporcionado con el kit, cuyo tamaño es de 36 Kb, y un patrón de pesos moleculares comercial “Low Range PFG Marker” (New England Biolabs) de un rango entre 0,1 y 200 Kb.

Para la validación de la genoteca se seleccionaron 4 clones al azar, los cuales se crecieron y se les indujo la multiplicación del fósido. Se llevó a cabo la extracción de DNA utilizando el kit comercial “GenElute Plasmid Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich). Usando la enzima de restricción BamHI se llevó a cabo la digestión de los mismos. Se utilizó este enzima ya que sólo tiene dos sitios de corte en el vector flanqueando al sitio de inserción del inserto. La figura 11 muestra que todos los clones poseen una banda común de 9kb correspondiente al vector y el tamaño

medio del inserto, que es la suma del resto de bandas, oscila entre 35 y 45 kb. Teniendo en cuenta que el tamaño del genoma de *P. digitatum* es de 26 Mb (Marcet-Houben et al., 2012) y de acuerdo con la fórmula  $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ , donde N corresponde al número de clones que debemos obtener, P es la probabilidad deseada y f es la proporción del genoma contenida en un clon, la probabilidad de que cualquier fragmento de DNA esté representado en esta genoteca es superior al 99,99 %.



**Figura 11.** Digestión con la enzima de restricción BamHI de los fósmidos obtenidos de 4 clones seleccionados al azar de la genoteca. Como marcadores de peso molecular se utilizaron  $\lambda$ DNA, cuyo tamaño es de 50 Kb,  $\lambda$ DNA digerido con el enzima de restricción HindIII y el marcador comercial 1Kb. La flecha roja corresponde a una banda de 9 Kb correspondiente al tamaño del vector.

## **1.2 Transformación de *P. digitatum* mediada por *A. tumefaciens* (ATMT)**

### **1.2.1 Sensibilidad de *P. digitatum* a higromicina**

La mayoría de las transformaciones que se han realizado en hongos filamentosos han usado como marcador de selección el antibiótico higromicina. Por esta razón el primer paso fue determinar la concentración mínima inhibitoria de higromicina para el aislado de *P. digitatum* Pd1. Se inocularon  $10^5$  conidios en placas de PDA suplementadas con higromicina a diferentes concentraciones (0, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los resultados mostraron que la germinación de los conidios de *P. digitatum* fue inhibida en medio PDA conteniendo concentraciones  $\geq 100$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  higromicina. Por lo tanto, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue considerada la concentración mínima inhibitoria de higromicina para la selección de transformantes de *P. digitatum* en los experimentos de ATMT.

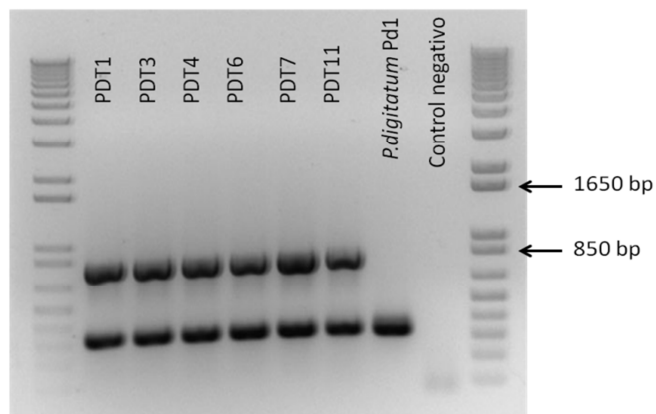
### **1.2.2 Transformación de *P. digitatum***

La transformación de *P. digitatum* fue llevada a cabo usando la cepa de *A. tumefaciens* LBA1100 conteniendo el plásmido pTAS10 (cedida por el Dr. Hooykass). El vector pTAS10 es un vector binario que contiene la región codificante del gen de resistencia a higromicina de *E.*

*coli* bajo el control de las secuencias del promotor de *gpd* y del terminador *trpC* de *Aspergillus nidulans* situadas entre los bordes izquierdo y derecho del T-DNA, que es la zona que se integra dentro del genoma del huésped.

### **1.2.3 Análisis molecular de los transformantes**

Para confirmar la integración del T-DNA en el genoma de *P. digitatum*, se seleccionaron varios transformantes al azar para analizar la presencia del gen de resistencia de higromicina. Además, se utilizó el gen *pg1* de *P. digitatum* que codifica una poligalacturonasa como control. Para confirmar la integración del T-DNA se realizó una PCR dúplex usando los oligonucleótidos específicos de higromicina HMBR1 (5' CTG ATA GAG TTG GTC AAG ACC 3') y HMBF1 (5' CTG TCG AGA AGT TTC TGA TCG 3') además de otro par pertenecientes al gen *pg1* de *P. digitatum*, PDIGPG1A2 (5' CGT AAT CCT GCT CGA TGA 3') y PDIGPG1S2 (5' TGG CTA TCA ACT CTG GCT 3'). Sólo en los transformantes se amplificó un fragmento específico de 799 pb correspondiente al gen de resistencia a higromicina, indicando que el T-DNA se ha integrado en el genoma de *P. digitatum*. Además, tanto en la cepa silvestre como en todos los transformantes se amplificó un fragmento de 327 pb correspondiente al gen que codifica la poligalacturonasa (Figura 12).

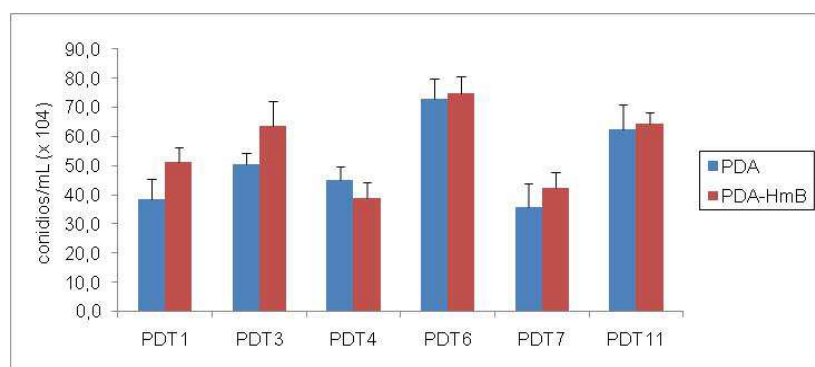


**Figura 12.** PCR dúplex de 6 transformantes aleatorios. Para la confirmación de la integración del T-DNA se utilizaron los oligonucleótidos específicos de higromicina HMBR1 y HMBF1, que amplifican un fragmento específico de 799 pb, y la pareja PDIGPG1A2 y PDIGPG1S2 que amplifican un fragmento de 327 pb correspondiente al gen *pg1* de *P. digitatum* que codifica una poligalacturonasa. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador comercial 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) que comprende tamaños entre 100 y 12000 pb.

### **1.2.4 Estabilidad mitótica de los transformantes**

Para confirmar la estabilidad genética de los transformantes se seleccionaron seis transformantes (PDT1, PDT3, PDT4, PDT6, PDT7 y PDT11) y se incubaron en placas de PDA sin higromicina a 24 °C durante 8 generaciones. En cada pase se recogieron las esporas de la placa tras 7 días de incubación, se diluyeron en agua a una concentración de 10<sup>6</sup> conidios/ml

y se sembraron  $10^5$  conidios en una nueva placa de PDA. Al final se sembraron por triplicado alícuotas en placas de PDA sin higromicina y otras tres alícuotas en placas de PDA con higromicina a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  y se hizo recuento de colonias a las 72 h de incubación a  $24^\circ\text{C}$ . En la gráfica se representa los recuentos y las desviaciones estándar de las tres réplicas de cada transformante (Figura 13). Los resultados muestran que no hay diferencias entre el número de colonias obtenidas en medio con y sin higromicina, sugiriendo que estos transformantes son mitóticamente estables.



**Figura 13.** Estabilidad mitótica de los transformantes de *P. digitatum*. Los transformantes PDT1, PDT3, PDT4, PDT6, PDT7 y PDT11 se sometieron a ocho pases en medio PDA sin higromicina. A continuación se hizo recuento de colonias con sus desviaciones estándar de 3 réplicas de una dilución que tiene teóricamente  $10^6$  conidios/ mL en placas de PDA sin higromicina y otras tres alícuotas en placas de PDA con  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina B.

### **1.2.5 Optimización del sistema ATMT para *P. digitatum***

El fondo genético de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* también juega un importante papel en la eficiencia de la transformación. Además de la función de la región *vir*, el reconocimiento y unión de *A. tumefaciens* a la superficie del huésped también depende de los genes codificados en el genoma de la bacteria. Una vez comprobado que el sistema ATMT es funcional en *P. digitatum*, elegimos tres cepas representativas de *A. tumefaciens*, LBA 4404, EHA 105 y AGL-1, y comparamos su habilidad para poder transformar *P. digitatum*. La cepa LBA 4404 es una cepa octopina de *A. tumefaciens*, con el cromosoma Ach5. Esta cepa crece lentamente y fácilmente condensa formando agregados. Las cepas EHA105 y AGL-1 pertenecen al tipo de las succinamopinas (o agropinas) y su cromosoma es C58. Ambas cepas proceden de una común, EHA101 (genotipo C58 pTiBo542) (Hood *et al.* 1986), con la excepción de que la cepa AGL-1 posee una delección extra en la región T del cromosoma que también elimina el gen de la aminoglicosil fosfotransferasa (*aph*). Estas cepas exhiben un crecimiento rápido, son altamente infecciosas y no forman agregados. La cepa EHA105 de *A. tumefaciens* transfiere el T-DNA en *Penicillium marneffeii* más eficientemente que la cepa LBA 4404 (Zhang *et al.* 2008).

Las tres cepas ensayadas contenían el plásmido pHUEegfp (cuya construcción se describirá más adelante). Se obtuvieron transformantes de *P. digitatum* con las tres cepas de *A. tumefaciens*, aunque las eficiencias de transformación difirieron entre ellas. Para los dos períodos de tiempo de coincubación ensayados, la cepa de *A. tumefaciens* AGL-1 tuvo la mayor eficiencia de transformación y la cepa LBA 4404 tuvo la menor eficiencia, indicando que la cepa de *A. tumefaciens* utilizada afecta a la eficiencia de la transformación de *P. digitatum*.

Se ensayaron varios parámetros para optimizar el proceso de transformación. El tiempo de co-incubación es un paso crítico en el proceso de transformación. Seleccionamos dos períodos de tiempo (72 y 96 h). Para las tres cepas empleadas la proporción de transformantes obtenidos en los dos períodos fue similar, por lo que un período de co-incubación de 72 horas es suficiente para la transformación.

Otro factor de relevancia es la concentración de conidios de *P. digitatum* que se usa en la co-incubación. Se ensayaron tres concentraciones diferentes ( $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  conidios/mL). La concentración seleccionada para futuros experimentos fue la de  $10^5$  ya que con las otras concentraciones más elevadas se obtenía mucha cantidad de transformantes siendo difícil la separación de transformantes individuales, y con esta concentración se obtenía la suficiente cantidad para poder trabajar con facilidad con transformantes independientes.

### **1.3 Proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein)**

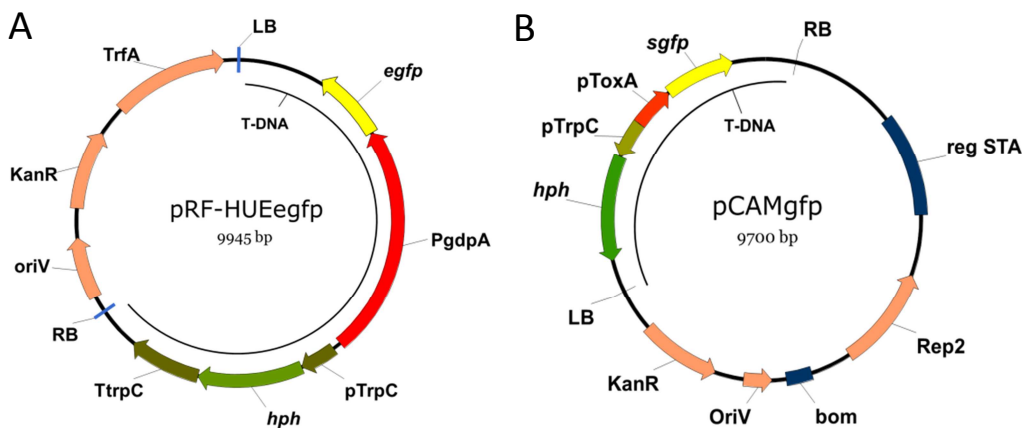
El empleo de la proteína GFP ha abierto nuevas vías de estudio en hongos fitopatógenos. Su uso como marcador del organismo completo ha suministrado nuevos datos que antes eran difíciles de obtener por otras técnicas, como es el proceso de propagación y el seguimiento del proceso de infección. Este tipo de marcaje no sólo permite monitorizar el proceso de infección fúngica sino también realizar estudios comparativos entre la estirpe silvestre y estirpes mutantes afectadas en el proceso de patogénesis.

#### **1.3.1 Vectores de expresión de la proteína verde fluorescente**

La primera aproximación consistió en la transformación de *P. digitatum* con la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404 conteniendo el plásmido pPK2-HPHGFP, el cual posee el gen que codifica la proteína GFP original bajo el control del promotor del gen que codifica la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans* (*gpdA*) y el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* (*trpC*). Esta cepa fue cedida amablemente por la Dra. Clara Pliego (IFAPA, Málaga, España). En ninguno de los transformantes se obtuvo fluorescencia alguna. Atendiendo a la bibliografía y a los resultados negativos obtenidos con la versión nativa de GFP se llevaron a cabo nuevas construcciones con dos versiones diferentes de GFP que son funcionales en hongos filamentosos; una es la versión sGFP y otra la eGFP. Ambas han sido utilizadas con éxito en diferentes especies fúngicas. Posiblemente la diferencia en la preferencia de uso de codones en hongos filamentosos y los presentes en el gen *gfp* nativo conlleva que se produzcan cantidades de proteína muy bajas y no se pueda detectar fluorescencia (Fernández-Ábalos *et al.* 1998).



Se utilizaron dos plásmidos conteniendo las dos variantes de GFP. La versión eGFP fue obtenida del plásmido pEGFP C3 (Invitrogen, cedido por el Dr. J. F. Marcos del IATA) y fue clonada en el plásmido pRF-HUE (Frandsen *et al.* 2008). Este vector contiene también el casete de higromicina como marcador de selección, además contiene un promotor constitutivo (el del gen que codifica la gliceraldehido-3-deshidrogenasa de *A. nidulans* *PgpdA*), tras el cual se clonó el fragmento de 719 pb del gen *egfp* amplificado con los oligonucleótidos EGFP 03 y EGFP 04, obteniéndose el plásmido pRF-HUE-EGFP (Figura 14A). La variante sGFP está incluida en el plásmido binario pCAMBgfp (Figura 14B), cedido amablemente por la Dra. Anne Osbourn (John Innes Center, UK). En este plásmido la expresión del gen *sgfp* está bajo el control del promotor del gen *toxA* de *Pyrenophora tritici-repentis* (Lorang *et al.*, 2001) y se ha demostrado una alta expresión constitutiva en ocho especies diferentes de hongos filamentosos.

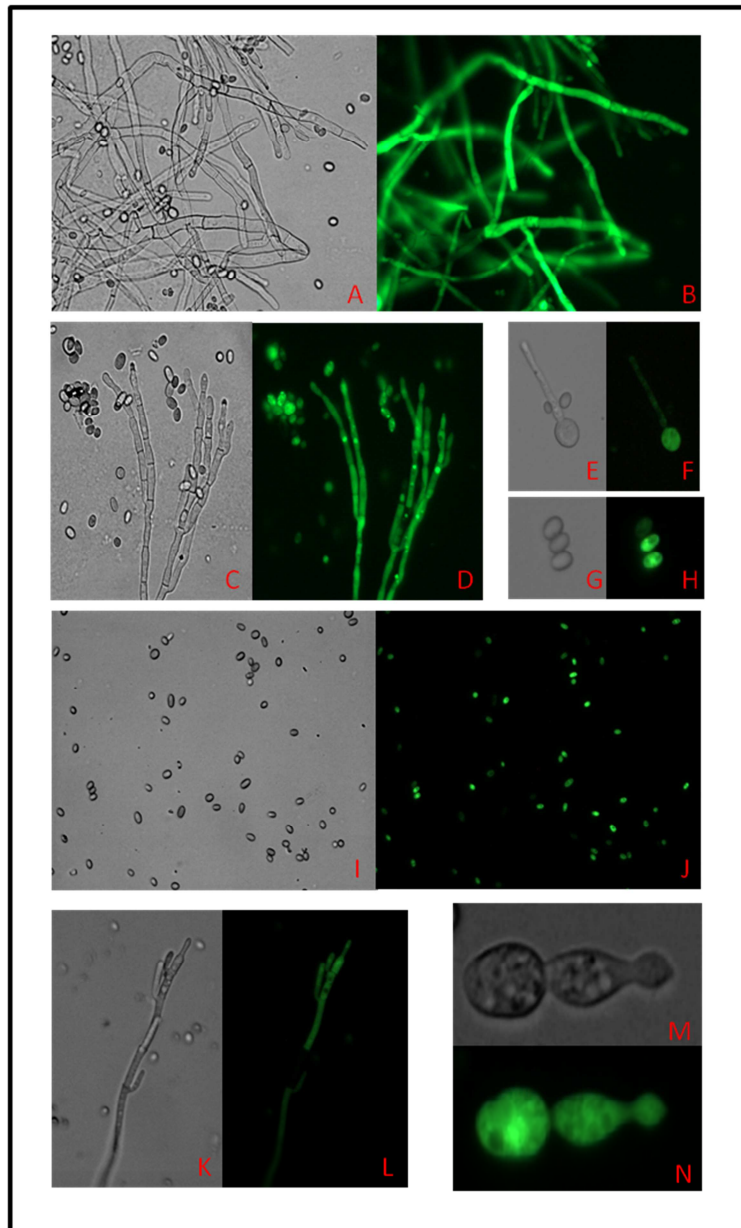


**Figura 14.** Representación esquemática de los vectores utilizados para la proteína verde fluorescente. (A) pRF-HUEegfp, (B) pCAMgfp (Sesma y Osbourn, 2004).

### 1.3.2 Microscopía

Ambos plásmidos binarios pCAMBIAgfp y pRF-HUE-EGFP fueron introducidos en *P. digitatum* tal como se explica en el apartado 10 de Materiales y Métodos. La selección de transformantes se realizó en medio PDA suplementado con higromicina. En un grupo de transformantes resistentes a higromicina se comprobó la presencia del gen de resistencia a higromicina mediante PCR normal con los oligonucleótidos HMBR1 y HMBF1. A continuación, se examinó si eran fluorescentes con un microscopio de epifluorescencia usando el filtro FITC. Todos los transformantes analizados poseían la fluorescencia verde característica. Aunque se obtuvo una fuerte expresión de GFP con el uso de ambas construcciones, la

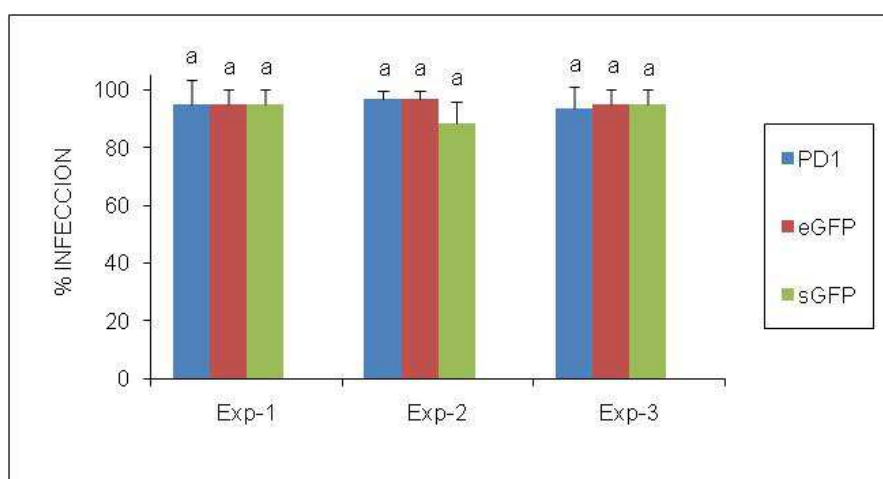
intensidad de la fluorescencia obtenida con la variante sGFP fue mayor que con la variante eGFP. Todas las partes de la estructura del hongo, incluyendo conidios, micelio y conidios germinando mostraron emisión de fluorescencia (Figura 15).



**Figura 15.** Visualización microscópica de diferentes estadios de transformantes de *P. digitatum* con las dos variantes de la proteína verde fluorescente utilizadas, con su correspondiente área visualizada en campo claro. Los paneles A, B, C, D, E, F, G y H corresponden a transformantes con la variante sGFP y los paneles I, J, K, L y M a transformantes con la variante eGFP. La fluorescencia se visualizó con un microscopio de epifluorescencia usando el filtro FITC.

### 1.3.3 Ensayos de infección transformantes de GFP

Una vez se comprobó la presencia del T-DNA en los transformantes, así como la expresión de la proteína GFP mediante microscopía, se quiso comprobar si la capacidad infectiva de los transformantes se había visto afectada, ya que el uso de la proteína verde fluorescente puede ser una herramienta molecular útil para el estudio de las interacciones compatible e incompatible entre patógeno y huésped y detectar y visualizar el proceso de infección *in situ*. Para tal finalidad se realizaron ensayos de infección como se detalla en el apartado 2 de Materiales y Métodos en frutos de naranja “Navel Late” con transformantes de *P. digitatum* que expresan las dos variantes de la proteína verde fluorescente utilizadas (eGFP y sGFP) comparadas con la cepa silvestre. El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD indicó que la capacidad infectiva de los transformantes no se vió alterada (Figura 16) y por lo tanto se demuestra la idoneidad del uso de las variantes eGFP y sGFP como marcadores de *P. digitatum* en la monitorización de la interacción fruto-patógeno. Los ensayos se realizaron por triplicado obteniendo los mismos resultados en todos ellos.



**Figura 16.** Incidencia de la infección en frutos “Navel Late” inoculados con los transformantes de *P. digitatum* que expresan las variantes eGFP y sGFP de la proteína verde fluorescente. Se realizaron 3 experimentos independientes. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD para cada tratamiento. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto) con  $10^4$  conidios/ml. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). El análisis se llevó a cabo independientemente para cada uno de los experimentos.

### 1.4 Obtención de mutantes de *P. digitatum* carentes del gen *ku80*

Al realizar las transformaciones con las construcciones de *pacC*, que se describen más adelante en la memoria, se analizaron más de 500 transformantes crecidos en placas de PDA con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina sin obtener ningún mutante en el que la integración del DNA

en el genoma hubiese sido por recombinación homóloga. Estas construcciones tenían alrededor de 1 kb de promotor y terminador del gen flanqueando al marcador de selección.

Un fragmento de DNA exógeno puede integrarse en el genoma huésped por la acción de mecanismos de reparación de rotura de doble hebra (double-strand break, DSB). Las DSBs son las formas más severas en las que el DNA puede ser dañado y deben ser reparadas para prevenir mutaciones o reordenamientos en el cromosoma que pueden causar frecuentemente la muerte celular. En eucariotas las dos principales vías de recombinación son la recombinación homóloga que implica la interacción entre secuencias homólogas y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, "nonhomologous end-joining") que involucra la ligación directa de las hebras independientemente de la homología del DNA. En la mayoría de los organismos, incluyendo los hongos filamentosos, NHEJ es el mecanismo usado preferencialmente para la reparación de las roturas de la doble hebra, lo que conduce a un mayor porcentaje de eventos de integración ectópica y a una menor frecuencia de recombinación homóloga a la hora de intentar la delección de un gen deseado. Esta es una posible causa por la cual no se obtuvieron mutantes nulos carentes del factor de transcripción PacC.

La vía del NHEJ puede ser inactivada por la eliminación de los genes *ku70* o *ku80*, que codifican las proteínas formadoras del heterodímero KU70/KU80. Mutantes deficientes en cualquiera de estos dos genes presentan un incremento del porcentaje de HR por disminución de la función de NHEJ. Por este motivo nos planteamos clonar, secuenciar y obtener un mutante de *P. digitatum* carente del gen *ku80*, con la confianza de conseguir aumentar el porcentaje de recombinación homóloga.

Para el aislamiento del gen *ku80* de *P. digitatum* se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias de otros hongos filamentosos obtenidas de la base de datos pública del NCBI. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de los genes *ku80* de *A. oryzae* (AB214651.1), *A. fumigatus* (DS499595.1) y *P. chrysogenum* (CS181303.1). A partir del alineamiento se diseñaron los oligonucleótidos ku80A1 (5'-TCC ARA GGW GGR AAM CGA TA-3') y ku80S1 (5'-GAR TGG GYC ATG SAR TAT GT-3') con los que se realizó un escrutinio mediante PCR de la genoteca de DNA genómico de *P. digitatum* (PD1G) obtenida en esta Tesis hasta obtener un clon positivo. A partir de DNA de este fósido se secuenció todo el gen así como promotor y terminador mediante paseo genómico, sintetizando oligonucleótidos en función de las lecturas de reacciones de secuenciación previas.

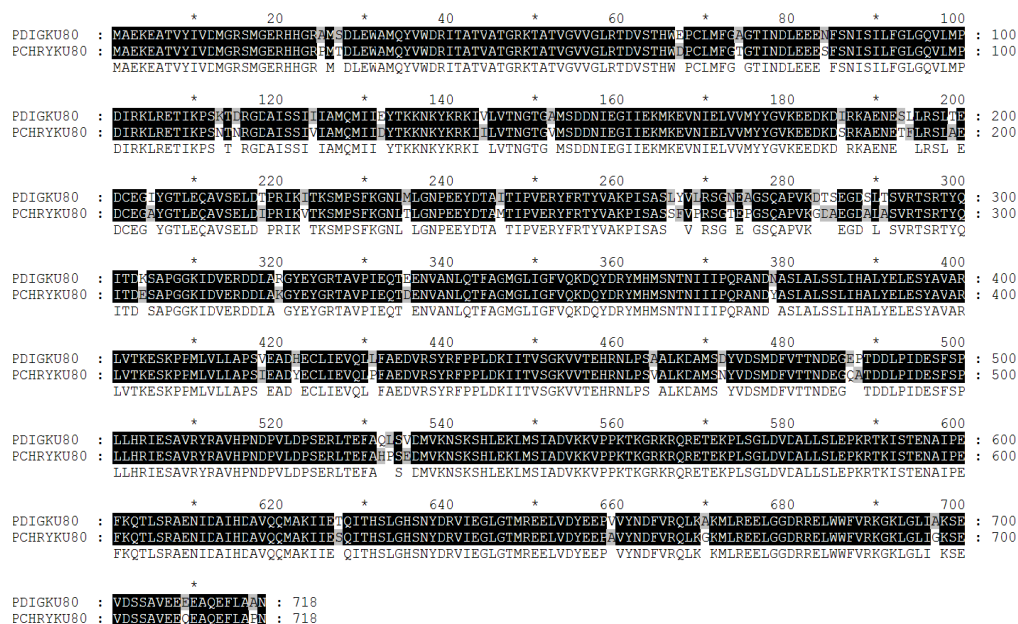
En total, se secuenciaron 6186pb de los cuales 1743 pb corresponden a la región promotora, incluyendo parte de secuencia que codifica una proteína hipotética de función desconocida, 1771 pb corresponden a la región terminadora, que incluye una proteína tirosin-fosfatasa (PTP) la cual cataliza la desfosforilación de péptidos fosfotirosina regulando el nivel de los mismos en las vías de transducción de señales, y 2672 pb correspondieron a la secuencia completa del gen *ku80*. El alineamiento múltiple de la secuencia con otros genes *ku80* de hongos filamentosos fue utilizado para determinar el codón de inicio y de parada y la localización de los intrones/exones. Basado en este análisis el gen *ku80* contiene 11 intrones

(posiciones 130-175, 231-250, 270-309, 352-414, 482-535, 707-751, 813-865, 1372-1424, 1810-1854, 2078-2132, 2602-2654 en la Figura 17) y 12 exones, que codifican una proteína de 713 aminoácidos con un peso molecular teórico de 80,10 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5,05. Respecto a la composición de aminoácidos, el que se encuentra en mayor proporción es alanina (7,0 %), seguido de arginina (6,0 %) y asparagina (3,5 %). El número total de residuos cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico) es de 119 y de residuos cargados positivamente (arginina y lisina) es de 89. La comparación de la secuencia del gen *ku80* con las recientemente depositadas en el NCBI para las dos cepas de *P. digitatum* Pd1 (PDIP\_73590) y PHI26 (PDIG\_64250), ha mostrado que tanto la secuencia del gen como de las regiones reguladoras flanqueantes son 100 % idénticas a Pd1 y un 99 % a la de PHI26 variando únicamente en un nucleótido dentro del gen.

-1743 GGCATGAATGATATCTGCGGCCGTTTGTATCTGATCAGCAGCGGTTCTGATCAGGTAGCGAT  
-1680 GTTAAACACCTCATATCTGCGATAGGAAACCTTTGAAGTAAAGTTTACGTTGGTAAATACCTACGACGGCAGTAC  
-1600 GCTAGATGTTACGCTTGTGGTGTATATGCGCTTGTCAAGTCTATCATGTTGCTGGTAAATACGACATCAACAGTCACT  
-1520 GGTCTTACAGTCAAGGTATATTTAGGTCGCGTGGTGTCTGAAACAGTATGTTAGTTTAACTACCAGGAGAAACGGTGT  
-1440 CGCAAATATAAGTGTGTTTGTGATGCTGACATCAGGCTCGACGGGCTGACATGCTGATGTTACATCTTGAACCGAAGTTC  
-1360 GATGGTTCAATCTCGCAACTGCTCTGGATTTGACTTTGAGGGGCGCAATAATCTGCAAAATAAGAGAAGAAATGAGGTCT  
-1280 TCGCTGACAGCAGGTGTTCTTGGACGAACAGGTCGAGTTAAATCGATTACCAATTTGGGATCTACTTGGCCGTAATCTTCAG  
-1200 CCCAAGCCTTGGATATGACAAATTTTATGCAATTCAGTTGCTAGCCCTTTGGCTGACGACGAAAGGATCAACAGAT  
-1120 CATCTGTTTTCATTTGCAATGATGACAGAGGGGCGAAATGAACGAAATGTCGAGAAAGGGCTATGTCATCCAACTCTCT  
-1040 TTTGAGTGTGCTATTTAGTCTGCTTCTCAAATTTACTCAAGTCTTTACTTTAGCACAGCCGTACCAGTCTGAGCAAC  
-960 CAGGCTGACCAAGTTGACCAAGCTCGAGATGCCATGCACGGCAGCCGACTTCTTTGTCAGGGCCAGCATCTCTTTGGAGT  
-880 GAGGCGCGGGTCTGAGCTCTCTTTCCGCTCAGGGTTCTTTCGCAAGGTTAGAAATTTTCAACTAATCTTTTACCCGAAATA  
-800 TAGTACCAGCAGCCAAOCACCTTGTATGCTTCCGCTCGCGCATCACTTGTGGTCACTGGGACGCAACACGAAACATATTC  
-720 ACCAATCCAGTCACTGTCACGGTTGCCAGAGGCAAGAGGGTGTAAAGTGGTCTTCAAGTGCCTGGAGACACGACAGGCC  
-640 CAACACTTGTCCGTCTAGGAAAGCGGTCAAGCGACCACTATAGGACGCGACTTTGACAGTGGAAATAGATGGGGAAGA  
-560 TGGCACTCTGACAGTACGGAATCGGGCCGGAAAGTGCACGGAAGCAACGAGCCCTCGCAGAAAGACTTGAATAT  
-480 GTCAGACAAATCTTTTGSAGAGCAATTTCAAATATGCGCCCGGTTACAGATATCTGACTTCAACCTTCCCTGTGCTCTCT  
-400 AGAAGGGTSCGAAAGCTGCCTCACTTATTTAGAACATAGGCTATGATTTTCACTAAITCAACAAACCTTTATAACATGATAGG  
-320 GGGCAGGATCCATGATTTTCAGATTTGTTTTCAGCTCGGAGAGTTAAGTTGGGGATTAAGTTGGAGCGAGGTGCAACGA  
-240 GGGGAAGAAAGTGGATATAATCACCACAGCCCAATTTCTAGTAAAACCTTTACTTCACTTCCAGTAAATGGGACAGATGTCG  
-160 TATATCGACGACCGGACCGCAACACAGCAAGAGCGGGGTGACGTCAATGATTTTCGGCTTTCGGCTTAAACCGCA  
-80 AGTGGAAATATCAGCGCTGCTGCTGTTGTCGAGCCTCAAGTGGTTCGACTTGGCAATTTTCAAACTTTTCAACATATC  
1 ATGGCGGAAAGAAAGCTACAGTTTACATTTGATAGCATGGGACGGTCCAATGGGTAGCGACACCAATGGCCGTCTGTATGTC  
81 AGATCTCGAATGGCCATGCAATGCTTGGGATAGAAATCACCCACGGatgtgactgtactgtttaaagccagag  
161 aactgactattccagGTGGCTACCGGACGAAAGCGCCACTGTTGGTGTGGTCTCAGAAACAGATGtgtagtggtgta  
241 gcctaccagTCAGCACCCATTTGGGACCTTgtctcctatgttcggagcaggaactcaacgacttggaaAGAGAACTTC  
321 TCTAATACTCTTCTTCTTCCGGCTTTGGCCAGtatgtggggccttgatgaaatgactgttaatggttagtacttgactg  
401 aaatcatctttaggtGTCTCAATGCTGATATTCGGAACTTCGAGAGACGATCAAAACCCAGCAGAGTGCACAGAGGTGA  
481 TGTatgtgacagttgaagtatttcaagctgctagtctgactttatacagagCACTTCTCTTATCATCATTTGCCATGC  
561 AGATGATCATTTGAGTACCAAGAAACAAATACAGCGCAAGATTTGATCTGTTGACCAATGTTACCGGTTCGGATGAGC  
641 GACGATAATCTCAAGGTATCTCGAAAAGATGAAAGAGTCAACATGAGTGTGGTGTGATGTTtcttctgctgctg  
721 ttactttacatgaccttaacactatctagTGGTSCGATTTTGTGATGACCCCGAGTATGGTGTTCAGAAAGAAAGCAAAA  
801 GACTTTCGAAAGTaccacagctgtctcgaatgtttttgacccatgtaataagaatctctcctgagGCTGAAAGCAGAGGCC  
881 TTTCCGAAAGCCTGACCGAGGACTGTGAAGGTATTTATGGAACGCTGGAGCAACCTTTTCCGAACTGATATCTCCCGC  
961 ATCAAAAATCAACAGAGCATGCGCATTTTCAAGGAATCTCATGCTCGGCAATCCGAGGAGTATGACACAGCAATCAC  
1041 TATACCCGTGGAGCATACTTCCGAACTTACGTCGCAAGCCGATCTCAGCGAGCTGTGAGGTGTTAGCTGCTCCGCAAC  
1121 AGGCGGAAAGTCAAGCAGTCAAGACACTAGTGAAGCGGATTTCTCTCACCCTGGTGAAGCAATCCGCGGCAATACG  
1201 ATCAAGATAAGTCTGCGCCAGGGGTTAAGATCGACTGSAACCGGATGACTGCAAGCCGAGTACGATGACAGCGACTAC  
1281 AGCACTTCTATCGAAACAAACCGAGGAAATGTGCGCAATCTACAACCTTTGCTGGCATGGGGTGTATCGGGTCTGCTC  
1361 AGAAGGATCAGTctgtctcctacaggaatccaatgttacagcagctaaccttgccacttagTATGACCGGTACATGCA  
1441 TATGTCCAAACAGAAATATATAA TCCCTCAGCGTGCATAAGCAATGCGCTCTTCCGATTTACTTCTTATTCATGAC  
1521 TTTCAAGATTTGAGTCTATGCGGTGTCGCCACTGTTGACCAAGAAATCCTCAAAACCCAGGATGCTTCGTTTGGTACGCTC  
1601 TCCGTGAGGACAGATCATGAGTGTGATGCAAGTACAACTTCCATTTGCAAGACAGCTGCGGTGATGCTGCTCCGCAAC  
1681 TTTGATAGATCATCACTGCTCTTGGCAAGGTGTAAAGCAACCGCAACCTCCCAAGCGCCGCTCTGAAAGATGCGA  
1761 TGAGTGTATTCAGTGGACGATGATTTTCCGTTACCAAGATGATGAAAGGtaacagagctttgttagtatccagcaaa  
1841 ccagctaataaagCCAGGAAACCCAGGACGATCTCCCAATGACGAGTCACTTCTCACTTGTACCCGATGGAATGGAAT  
1921 AGCCGTTGATACCGGCTGTGSCATCCCAACGATCTCTGCTTTGACCCCTCAGAGGAGCTCAGGAAATTCGCAACAACTC  
2001 CAGTAGACA TGGTCAAGAACTCCAAATGCCATCTTGAGAAATGATGCTCTATAGCAGTCTTCTTCTTATTCATGCTC  
2081 tatatctacactctgaagaacccctactgaccaacgcatccgttatgacagTTCCACAAAGACCAAGGGCCGTAAACGC  
2161 CAACCGAAACAGAGAAACCCGCTCTCCGCTTTCAGCTCGACGCCCTCTCAGCTCAGAAACCAAGCAACAAATAATC  
2241 TACCAGAAATGCAATCCAGAGTTCAAGCAACACTTTCCCGCCAGAAAACATCGACGAATCCACGACGCTGTGCGC  
2321 AATGCTTAAATCATTSAGACCCAGATCAGCACAGTCTCGGTCACTCAAACACGACCGGTGTTACTCGAGGCTCAGG  
2401 ACTATGCGTGAAGGCTGTGGATTTATGAGAACCGGTTGTTGTAAGTACTTTGTCGCCAGTTGAAGGCTAAATGATGTT  
2481 CGGGGAGGAGCTGGTGGGATCGAGGGGAGCTGTGTTGGTTTGTGAGGAAAGGGGAACTTTGGGCTTATTTGGAGAGGTG  
2561 AGGTGGATGCTCGGCTGTTGAGGAAAGAGGCCAGGAGtaaggctcgatcttgggtggtgaaacaaagtgt  
2641 gacgctactttagTTTCTGGCTCAAAATGAGGAGTTGGTAGGAGTTGATTTAGGCTCTGTTTGAAGCATATTCATA  
2721 ATGTCTTGTACTCCAAATTTACCCTGCTGTGAGGCTTGCATATATATGATCTTCAATGCTTACCGTTGAAAGCATGGCCG  
2801 AGGAATAGTCAAGTATGCTCCGCTCATGGACTCAGTGCAGAGGTACTGACTTTATATGTAAGAGGATACGAGGTAG  
2881 AARGACTTTGGGAGAGAGAAATAGTGAACAAGCTCTTGAACCTGTAATTTTCGACCGAGAAATGACACACAAAGGAGC  
2961 AAAACCTGCACACACACTGTAAACGAAAGTGAAGOGATACCCTAATGCAAGCATGCGACGCTTCTTCAATCAACACC  
3041 AGAACCACAAACGCTTTATCAACATGCCCCAAATACCAAGTACTCTGCTCCAGAAAACCAACAGAGCCGAAATGTGCAAGCTC  
3121 AAACATTAAGAAAGCATCCAGATGCAATCGGAAAGGGGTATGCAAGAGTATTTGTCCCAATGGGACGAGAAAGTGAAG  
3201 AAGCGCTCTGGAGAAATTTGACAGATTTCCAAAGGCGAAATAGAGAACAAATGTTTAAATGGACAGTCTTGAATGGCCG  
3281 TGCAGGACTGATGTTATTTGCTACCAATACGACCACTAGGCTTGCAGACCCCTCAGACTCTGCGGGTGTGTTTCCGTCG  
3361 CCCGCGAGGGCTGTGCTATTTTACTGACCAGATAGGGCGACGCCGCTTTTACCGCTCATAGGAGTCTTGGGTGCT  
3441 GATGGTCAACCCAGTTTCTTCTGATCTTCTGTTGTTGTTCTTCTGAGAGTGTAGCTGGCTGTGACAGTGGCAGATGACT  
3521 GATAGACCGGGATGTTGGTGGGCAACAGGGGACCTGGATGACTTTGGGCTAATGCGCGAGCTGGATCTCTTCTTCC  
3601 TTTCACTGCTCTGCTTCTTCTTCTATGCTGCGGTGACTGCGCTGCTCACTTTTCAACGGCGAGGATCCGGAAGCAGTT  
3681 CGAGAAATAGGGTGGTGGCTGATCTTTCTGATGGATTTGCGAGGCTGGCCAGGGGTGGTGGTGGGAGGATCTCTGCTC  
3761 TGGGTAAAGCGCAGCTTCAATGATGATCAATCTCTCCAGGGCAGCCGCTTGAATGGCTGTTGTTGGTGGGTTGGAGA  
3841 CCACTCCATTGCTGGTGCCTTCTTCTGACACCCCGGAGTGAAGGGTGCAGATTTGCTTACTTCTTACCGCTTACGCAATG  
3921 TCTCAAAACCACTTCAAGGAAAGCACTTGGTGTAGGTGAGGCGAGTGTCTGAGGTCCAAAGCATTACCGGGTTCG  
4001 CATGAATCTCATGAAAGCAATTAATTTCAATTTGCTGTGAATCCATCTTGTAGATCAGGTAGCCCAATCAACATCCGG  
4081 TACCGCCAAAGCTTCTTTGAGTGAAGTGCATACCTTCTTCTTGAATGGTATCATCTTACGGCCATTTTGAATAAAC  
4161 CGCCTGCAAGCTGCAAGGGAGGGCAGTCCATCTCTCAAGATCATGTCACATGAGCAATTTCCATTTGCGGTGAAGTA  
4241 AGACGGCAGTAGAGCTCTGAAATGAGTCTGTAACCAAGACCGATGTTCCGCTGGTGAATAAGCAGAAACATCTTTGA  
4321 ATGGCTAGGAAGCTTCGAGGAAGATTTTCCGAGATTGTCTGCGCAATGCTTTGATCTCGGCGGTGTTGACAGGAATG  
4401 GGTCCACGGGCTGCTGCTGAGGAGATGCAAGGCAAGGAAATC

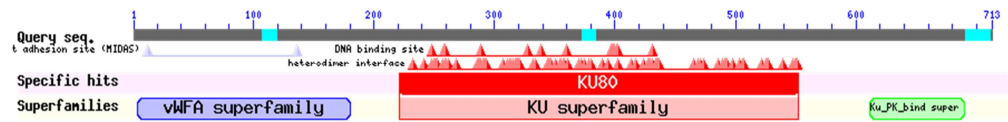
Figura 17. Secuencia completa del gen *ku80* de *P. digitatum*. En rojo se muestra la posición de los intrones, en negro las regiones promotora y terminadora secuencias. Dentro de las regiones promotora y terminadora se han localizado parte de la secuencia de otros genes que están marcadas en verde.

El análisis BlastX de la secuencia codificante mostró una identidad máxima del 91 % con la proteína Pc18g018200 de *P. chrysogenum* Wisconsin (número de acceso CAP94406.1) que corresponde a una proteína de 718 aminoácidos con todos los dominios característicos de la familia de proteínas Ku. En la figura 18 se muestra el alineamiento de ambas secuencias.



**Figura 18.** Alineamiento de la secuencia de la proteína ku80 de *P. digitatum* con la proteína Pc18g018200 de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin. (PCHRYKU80; número de acceso CAP94406.1 en la base de datos del NCBI). El alineamiento se llevó a cabo con el algoritmo ClustalX.

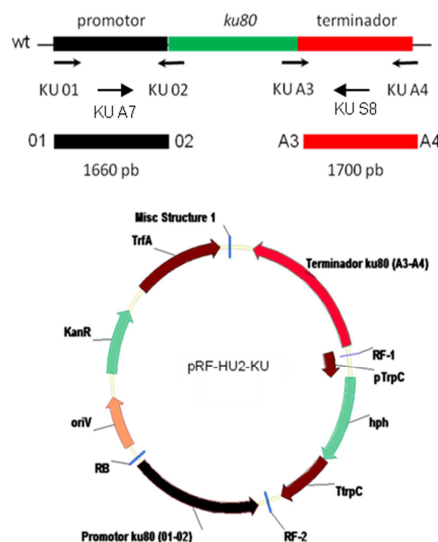
Una caracterización más profunda *in silico* de la estructura de la proteína KU80 de *P. digitatum* permitió la detección de 3 posibles motivos (Figura 19). Un dominio N-terminal “von Willebrand” factor tipo A (vWA) (aa 4-180), que media la interacción proteína-proteína, tales como la heterodimerización entre Ku70 y Ku80, así como la interacción con otras proteínas involucradas en la maquinaria del NHEJ. Un dominio central de la superfamilia Ku (aa 221-552) formado por una estructura de barriles beta, un anillo polipeptídico y un brazo C-terminal cuya función es la unión al DNA. El último motivo pertenece a la superfamilia de unión a proteínas quinasas (aa 611-690). Estos 3 dominios estructurales se encuentran conservados en todos los ortólogos caracterizados de Ku80.



**Figura 19.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína Ku80 de *P. digitatum*. Se identifican 3 motivos característicos de la familia de proteínas Ku: el N-terminal “von Willebrand” factor tipo A (vWFA superfamily), el dominio central de la superfamilia Ku (KU superfamily) y un tercer motivo que pertenece a la superfamilia de unión a proteínas quinasa (Ku PK bind superfamily).

**1.4.1 Obtención y caracterización de un mutante de *P. digitatum* carente del gen *ku80***

El objetivo planteado fue la delección del gen *ku80* para generar una cepa receptiva de *P. digitatum* con la que poder obtener mutantes de delección en otros genes diana con una frecuencia superior respecto a la cepa parental. Para ello se construyó el vector pRF-HU2-Ku (Figura 20) que contiene como marcador de selección el gen de resistencia a higromicina flanqueado por el promotor y el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. Flanqueando al casete de higromicina se introdujeron más de 1,5 kb de las regiones promotora y terminadora del gen *ku80*. Con las construcciones de *pacC* se introdujeron fragmentos de 1 kb y no se obtuvo ningún mutante de delección. Por ello se decidió aumentar el tamaño de los fragmentos hasta 1,5 kb, ya que en otros casos se ha demostrado que el tamaño de los mismos puede aumentar el porcentaje de recombinación homóloga. Las regiones promotora y terminadora fueron amplificadas por PCR. Un fragmento de la región promotora de 1660 pb fue amplificado con los oligonucleótidos KU-01 y KU-02 (Tabla 3), mientras que otro fragmento de 1700 pb del terminador fue amplificado con los oligonucleótidos KU-A3 y KU-A4 (Tabla 3). Estos dos fragmentos se unieron al vector pRF-HU2 previamente tratado con *PacI* y *NbvC1* mediante la técnica del “USER Friendly cloning” ya detallada en el apartado 7 de Materiales y Métodos, obteniéndose el plásmido pRF-HU2-Ku (Figura 20).

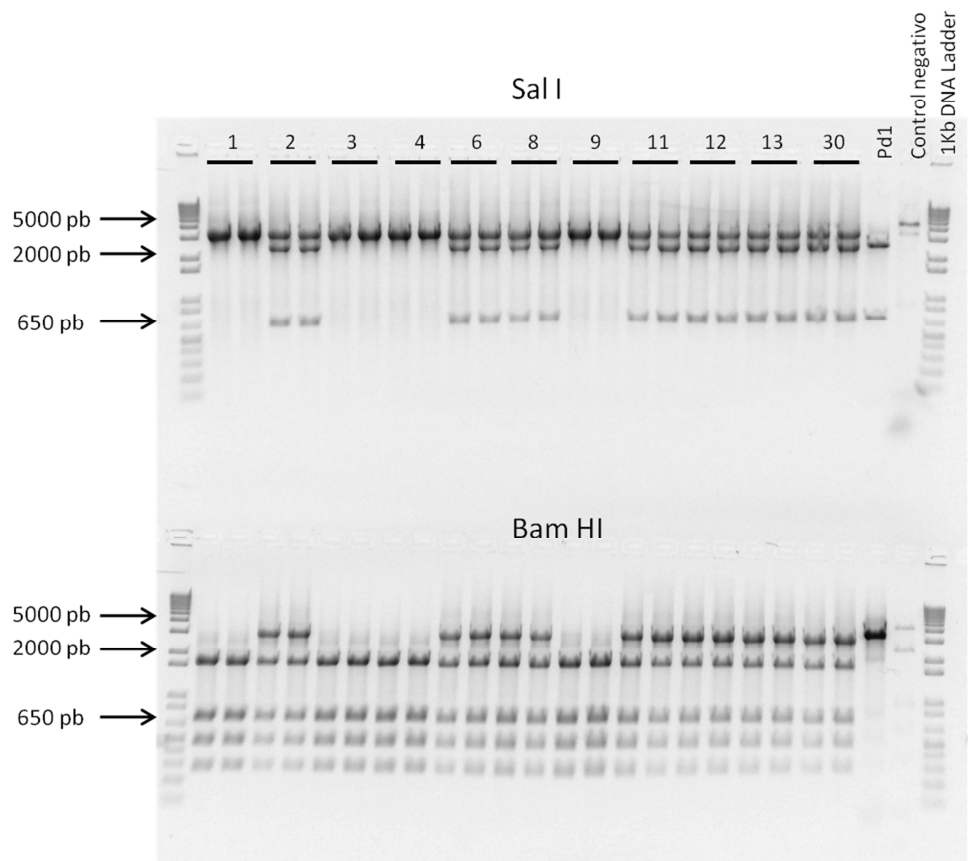


**Figura 20.** Representación esquemática del vector pRF-HU2-KU. KU 01 y KU 02 son los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento 01-02 que corresponde a 1660 pb de la región promotora y KU-A3 y KU-A4 son los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento A3-A4 que corresponde a 1700 pb de la región terminadora.



A través de la transformación mediada por *A. tumefaciens*, que se llevó a cabo como se describe en el apartado 10 de Materiales y Métodos de esta Tesis, se introdujo la construcción pRF-HU2-KU en el aislado de *P. digitatum* Pd1. El resultado esperado es que en algún transformante tuviese lugar la recombinación homóloga de las secuencias flanqueantes del gen de resistencia a higromicina del plásmido y las del genoma del hongo para así sustituir el gen *Ku80* por el gen de resistencia a higromicina. La selección de transformantes se llevó a cabo en placas con medio PDA suplementado con higromicina.

Mediante PCR se diferenció entre los transformantes que integraron correctamente la construcción mediante recombinación homóloga y, por lo tanto, eliminaron el gen *ku80*, y los que la integraron ectópicamente, y por lo tanto aún conservan la copia del gen. Se extrajo DNA genómico de 30 transformantes seleccionados al azar y se realizó una PCR con los oligonucleótidos KU-A7 y KU-S8 (Materiales y Métodos). Estos oligonucleótidos se encuentran situados dentro de la secuencia de la construcción presente en el plásmido pRF-HU2-KU y por lo tanto amplifican tanto en la cepa parental, como en los transformantes de delección o en los ectópicos, aunque los tamaños del amplicón son diferentes. Ya que las diferencias de tamaño de los dos amplicones son pequeñas, se realizó una digestión del producto de amplificación con dos enzimas de restricción para diferenciarlos. La primera se realizó con BamHI, que reconoce tres sitios en el T-DNA, por lo que en los presuntos mutantes de delección debería originar 4 bandas (1800, 727, 480 y 289 pb). En la cepa silvestre sólo debe obtenerse una banda (3058 pb) porque no hay sitio de corte, mientras que en los presuntos mutantes ectópicos deberíamos obtener 5 bandas (3058, 1800, 727, 480 y 289 pb) que corresponden a la banda de la cepa silvestre y las 4 de la construcción. La segunda digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción Sall. Esta enzima de restricción no posee ningún sitio de corte dentro del T-DNA por lo que los presuntos mutantes de delección deberían tener una única banda correspondiente al amplificado original (3001 pb). En la cepa silvestre esta enzima sí que reconoce un sitio de corte por lo que origina dos bandas (2439 y 655 pb) y, como en el caso anterior, los presuntos mutantes ectópicos deberían tener tres bandas (3001, 2439 y 655 pb), dos correspondientes a la cepa silvestre y una al T-DNA integrado ectópicamente (Figura 21). De los 30 transformantes analizados 7 resultaron positivos, por lo que el porcentaje de recombinación homóloga obtenido fue del 23,3 %.



**Figura 21.** Análisis de transformantes de *P. digitatum* obtenidos con el plásmido pRFHU2-*ku80*. Digestión de las amplificaciones obtenidas por PCR con los oligonucleótidos KU-A7 y KU-S8 de varios transformantes de *P. digitatum*, presuntos mutantes de delección del gen *ku80*, con las enzimas de restricción *SalI* y *BamHI*. Todas las muestras están realizadas por duplicado. Los transformantes 1, 3, 4 y 9 son mutantes de delección del gen *ku80*,  $\Delta ku80$ . Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador comercial 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) que comprende tamaños entre 100 y 12000 pb.

#### **1.4.2 Comprobación número de copias mediante PCR en tiempo real**

Se seleccionaron varios transformantes en los que se había producido la delección del gen *ku80* para comprobar mediante PCR en tiempo real si además de la copia que sustituye al gen *ku80* se habían integrado copias ectópicas adicionales del T-DNA. Como gen de referencia se utilizó el gen que codifica la beta-tubulina, ya que se dispone de su secuencia completa en el NCBI y sólo hay una copia de este gen en el genoma. La diferencia entre los valores de Cps entre el gen control y el gen de interés debe ser la misma para la cepa silvestre y para los mutantes  $\Delta ku80$  que no presenten copias adicionales del T-DNA. Sin embargo, en aquellos mutantes  $\Delta ku80$  en los que se hayan introducido una o más copias adicionales del T-DNA el valor de la diferencia entre las Cps ya no será igual a la de la cepa silvestre ya que se amplificará la región promotora de todas las copias que se hayan

integrado. De esta forma podremos calcular el número de copias integradas en el genoma. Se analizaron cuatro de los transformantes en los que había ocurrido recombinación homóloga (KU-1, KU-3, KU-4 y KU-9) y dos transformantes ectópicos (KU-2 y KU-6) con los oligonucleótidos KU-Pr-S y KU-Pr-AS (Materiales y Métodos, Tabla 6) que se encuentran en la región promotora del gen *ku80* y están presentes en el T-DNA. Estos oligonucleótidos amplifican un producto de 95 pb.

Se determinó la eficiencia de amplificación realizando una curva estándar tanto para el gen diana (*ku80*) como para el gen de referencia ( $\beta$ -tubulina) utilizando como moldes una dilución seriada de DNA. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para el cálculo de la eficiencia se utilizó el método de dilución del estándar en el cual la pendiente de la curva estándar es lo que nos da la eficiencia (Eficiencia =  $10^{-1/\text{pendiente}}$ ). La eficiencia para el gen *ku80* fue de 1,964 y para el gen que codifica la  $\beta$ -tubulina fue de 1,979, en ambos casos dentro del rango comúnmente aceptado que se sitúa entre 1,8-2,0.

Una vez se comprobada que la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos era adecuada, se utilizó el Método del  $\Delta\Delta\text{Cp}$  para conocer el número de copias de cada gen que posee cada transformante. En este método se comparan directamente los valores de Cp (Crossing point, valor umbral donde empieza a observarse fluorescencia en la amplificación) del gen problema y del gen de referencia ( $\Delta\text{Cp}$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta\text{Cp}$  de los DNAs problema con respecto al de la cepa silvestre. El número de copias se calculó siguiendo la siguiente ecuación descrita por Pfaffl (2001):

$$\text{Ratio} = (E_{\text{diana}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{diana}}(\text{cepa silvestre-mutante})} / (E_{\text{referencia}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{referencia}}(\text{cepa silvestre-mutante})}$$

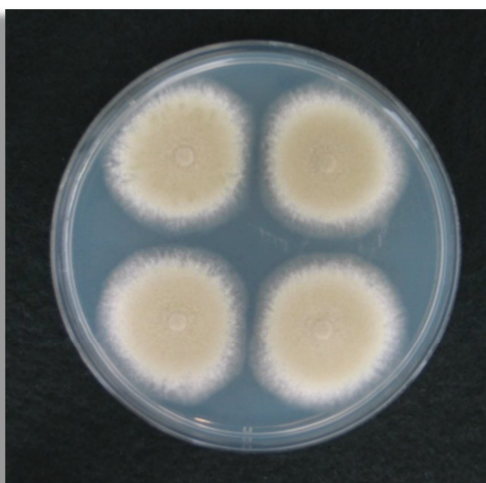
Según los datos obtenidos en las curvas para el cálculo de la eficiencia se emplearon 10 ng de DNA de cada muestra para llevar a cabo la PCR, analizando por duplicado cada una de las muestras. En la tabla 9 se muestran los resultados de la PCR en tiempo real en la cual se observa que los transformantes KU-3 y KU-9 tienen un  $\Delta\text{Cp}$  igual al de la cepa silvestre y por lo tanto no tienen ninguna copia extra. Los transformantes KU-1 y KU-4 tienen un valor  $\Delta\text{Cp}$  mayor que el de la cepa silvestre en un ciclo, por lo que tienen la copia truncada y otra más. De los 2 transformantes ectópicos KU-2 y KU-6 el valor  $\Delta\text{Cp}$  de ambos indica que tienen 3 y 4 copias del gen, por lo que estos mutantes presentan 2 y 3 integraciones ectópicas del T-DNA respectivamente, ya que una copia corresponde a la del locus de la cepa original.

**Tabla 9.** Determinación del número de copias del gen *ku80* en transformantes de *P. digitatum* mediante PCR en tiempo real. El gen que codifica la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ tub) fue utilizado como gen de referencia.

Muestra	$\Delta$ Cp ( <i>ku80</i> - $\beta$ tub)	n° copias <i>ku80</i>	Tipo de mutante	
Pd1 (wt)	-0,01	1		
KU-1	0,89	2	delección	+ 1 copia ectópica
KU-3	-0,04	1	delección	
KU-4	0,96	2	delección	+ 1 copia ectópica
KU-9	-0,01	1	delección	
KU-2	1,41	3	ectópico	(2 copias T-DNA)
KU-6	1,88	4	ectópico	(3 copias T-DNA)

#### 1.4.3 Análisis morfológico

Para determinar si la delección del gen *ku80* en *P. digitatum* afectaba a su desarrollo o morfología, se sembraron en placas de PDA sin higromicina los dos transformantes  $\Delta$ *ku80* y un transformante ectópico antes de analizar su capacidad infectiva. Como se muestra en la figura 22 no se observaron diferencias entre ninguno de los transformantes analizados en relación a la cepa silvestre.



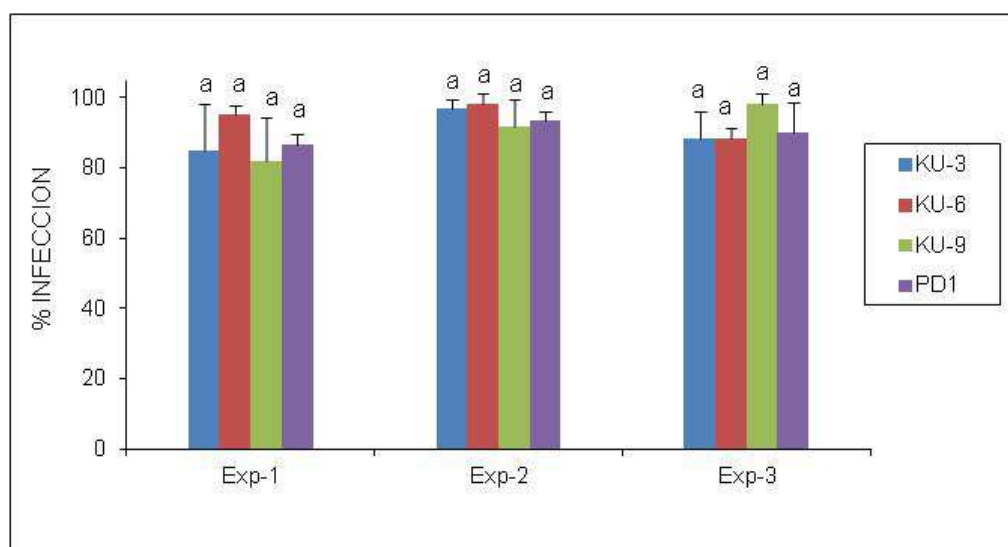
**Figura 22.** Crecimiento en medio PDA de tres transformantes del gen *ku80* de *P. digitatum*. Desde la parte superior izquierda y en sentido horario aparecen la cepa silvestre de *P. digitatum* Pd1, el transformante KU-3 ( $\Delta$ *ku80*), transformante KU-9 ( $\Delta$ *ku80*) y el transformante KU-9 (ectópico). Las placas se incubaron durante 5 días a 24 °C.

#### 1.4.4 Ensayos de infección

Una vez que se dispuso de dos transformantes de *P. digitatum* en los que se había eliminado el gen *ku80* y que no presentaban ninguna otra copia adicional del T-DNA, se estudió si su capacidad infectiva se había visto afectada. El objetivo perseguido es generar una cepa de *P. digitatum* con la que poder reemplazar eficientemente otros genes diana para estudiar su papel en patogénesis y una alteración en la capacidad infectiva de la cepa con la que se van a realizar las transformaciones no permitiría su uso para este fin.

Con esta finalidad se realizaron ensayos de infección en frutos de naranja "Lane late" con los transformantes del gen *ku80* de *P. digitatum* como se detalla en el apartado 2 de Materiales y Métodos. Se inocularon 10  $\mu$ l de una suspensión de  $10^4$  conidios/mL de tres transformantes y de la cepa silvestre Pd1 de *P. digitatum*. Se realizaron tres ensayos independientes con los transformantes KU-3 y KU-9, que carecen del gen *ku80* y no tienen copias adicionales del T-DNA, y el mutante ectópico KU-6, que presenta 3 copias de T-DNA integradas. En la figura 23 se muestran los resultados de los tres experimentos en los que puede apreciarse que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes  $\Delta ku80$ , el mutante ectópico y la cepa silvestre; todos tienen el mismo comportamiento.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que puede usarse un transformante  $\Delta ku80$  como cepa receptora para la delección de otros genes, ya que la eliminación de este gen no afecta a la virulencia.



**Figura 23.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes de *P. digitatum*. Los transformantes KU-3 y KU-9 son mutantes de delección del gen *ku80* y KU-6 es un mutante ectópico, mientras que Pd1 es la cepa parental. Las medidas de la infección se realizaron a día 5 tras la inoculación. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de forma independiente para cada experimento. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

### **1.5 Uso de fleomicina como marcador de selección en *P. digitatum***

Una vez obtenidos los mutantes  $\Delta ku80$  de *P. digitatum* y comprobado que su morfología y virulencia no variaban respecto de la cepa silvestre, era necesario disponer de otro marcador de selección distinto de higromicina para poder emplearlo en la selección de transformantes, ya que la cepa  $\Delta ku80$ , que es la que se emplearía en la transformación, ya es resistente a higromicina.

#### **1.5.1 Sensibilidad de *P. digitatum* a fleomicina**

Se hicieron ensayos para determinar la susceptibilidad de *P. digitatum* al antibiótico fleomicina. Se ensayaron 4 concentraciones de fleomicina (100, 50, 25 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y varias concentraciones de conidios del aislado *P. digitatum* Pd1 ( $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  conidios/ mL) en dos medios de crecimiento diferentes (YPD y PDA). Como puede verse en la Tabla 10, en medio YPD no hubo crecimiento en ninguna de las combinaciones utilizadas. En cambio, en medio PDA se observó crecimiento para la concentración de *P. digitatum* de  $10^8$  conidios/mL para las concentraciones de fleomicina de 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 11). Por lo tanto, para la selección de los transformantes se decidió utilizar una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio YPD.

**Tabla 10.** Ensayos de la susceptibilidad del aislado Pd1 de *P. digitatum* ante el antibiótico fleomicina en medio YPD.

Medio de cultivo	Concentración Fleomicina ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentración de conidios Pd1 (conidios/ mL)	Crecimiento
YPD	100	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No
YPD	50	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No
YPD	25	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No
YPD	10	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No

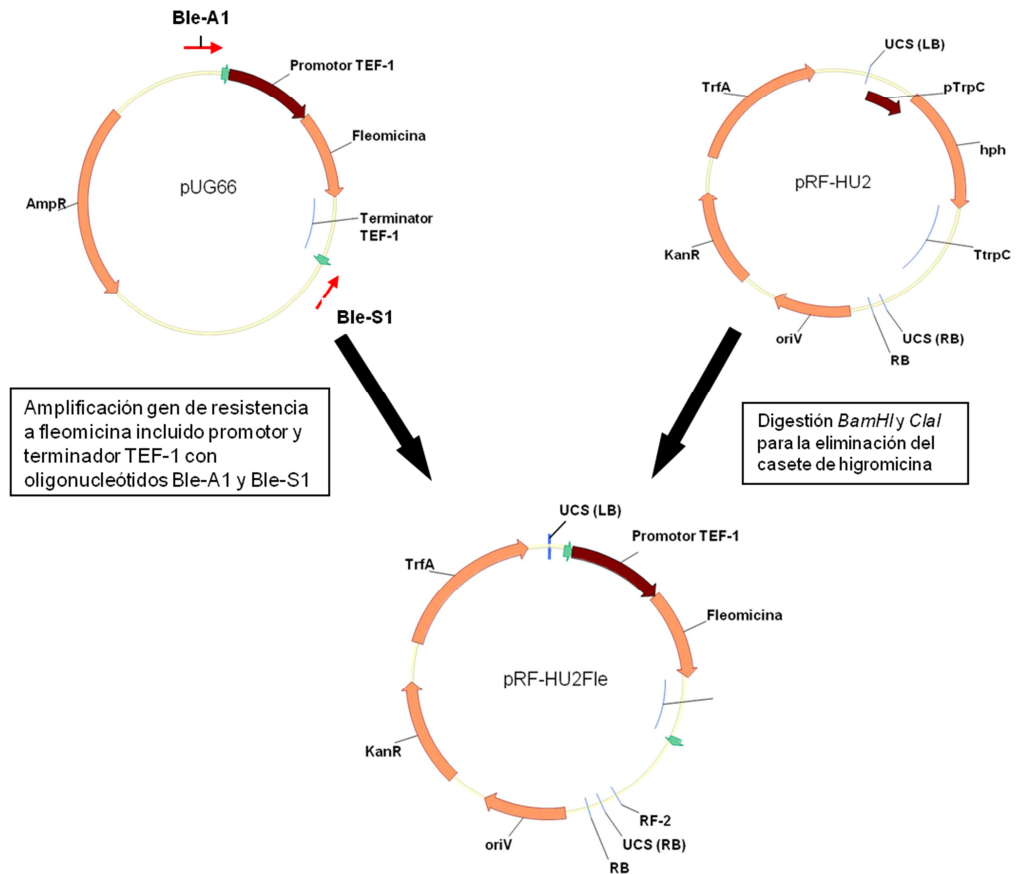
**Tabla 11.** Susceptibilidad del aislado Pd1 de *P. digitatum* al antibiótico fleomicina en medio PDA.

Medio de cultivo	Concentración Fleomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración de conidios Pd1 (conidios/ mL)	Crecimiento
PDA	100	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No
PDA	50	$10^8$	No
		$10^6$	No
		$10^4$	No
PDA	25	$10^8$	Si
		$10^6$	No
		$10^4$	No
PDA	10	$10^8$	Si
		$10^6$	No
		$10^4$	No

### **1.5.2 Diseño del vector pRF-HU2Fle**

Una vez se comprobó que se podía utilizar la fleomicina como marcador de selección para *P. digitatum*, se diseñó el plásmido pRF-HU2Fle. Este nuevo plásmido tiene como base el vector pRF-HU2 del que se eliminó el casete de resistencia a higromicina mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y ClaI. Por otro lado se diseñaron 2 oligonucleótidos, Ble-A1 y Ble-S1, con los cuales se amplificó el gen de resistencia a fleomicina junto con sus secuencias reguladoras (promotor y terminador) desde el vector pUG66 (Gueldener *et al.* 2002). Este plásmido pertenece a la colección EUROSCARF y posee el gen de resistencia a fleomicina flanqueado por el promotor *TEF1* de *Ashbya gossypii* y el terminador *TEF1* del mismo hongo.

Por último se procedió a la ligación de ambos fragmentos tal como se detalla en la figura 24.



**Figura 24.** Representación esquemática del diseño del vector pRF-HU2Fle. Del vector pRF-HU2 se eliminó el casete de resistencia a higromicina al digerir con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Cla*I. En su lugar se añadió el casete con el gen de resistencia a fleomicina obtenido del vector pUG66 amplificado con los oligonucleótidos Ble-A1 y Ble-S1.

### 1.5.3 Transformación de *P. digitatum* con el vector pRF-HU2Fle

Una vez finalizada la construcción del vector como se indica en el apartado 8 de Materiales y Métodos se transformó el aislado de *P. digitatum* Pd1 con el vector pRF-HU2Fle para comprobar si se podía utilizar como segundo marcador de resistencia. La selección de los transformantes se llevó a cabo en placas de YPD con una concentración de fleomicina de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La frecuencia de aparición de transformantes fue muy baja y las pocas colonias que se obtuvieron no eran capaces de esporular. Se seleccionaron 8 posibles transformantes y se pasaron a placas de PDA sin antibiótico. En las placas de PDA sí que hubo esporulación de los 8 presuntos transformantes. Se obtuvieron monospóricos de los mismos y se les extrajo el DNA genómico. Se diseñaron los oligonucleótidos Phleo A1 (5'- GCA ATT CGT TCT GTA TCA



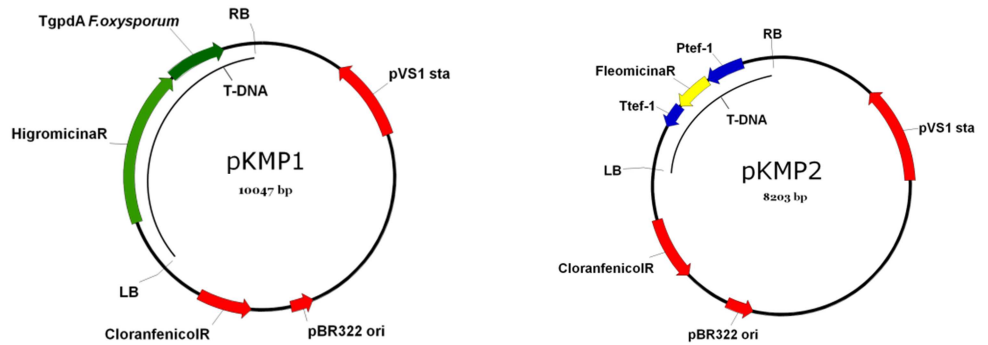
GG-3') y Phleo S1 (5'-ATC ACG AGA TTT CGA TTC C-3') que amplifican 365 pb dentro del gen de resistencia de fleomicina para verificar si los presuntos transformantes obtenidos contenían el gen de resistencia a fleomicina. Sólo 2 de los 8 presuntos transformantes dieron resultado positivo en la amplificación por PCR. Este resultado implica que la mayoría de las colonias resistentes a fleomicina son mutantes espontáneos resistentes al antibiótico, y sólo un porcentaje menor de colonias son realmente transformantes. Por lo tanto, aunque se podría utilizar la fleomicina como segundo marcador de resistencia, la frecuencia de integración es baja y los transformantes no esporulan en medio con antibiótico, por lo que la utilidad de este marcador es muy limitada.

### **1.6 Obtención de plásmidos binarios de RNA interferente para *P. digitatum***

Hay dos métodos principales para la obtención de mutantes en los que se produzca el silenciamiento génico. Uno es mediante disrupción génica, que es el método empleado en la obtención del mutante  $\Delta ku80$  descrito anteriormente, pero desde hace unos años se está implantando un nuevo método, RNA interferente, que está dando muy buenos resultados y que se está empleando en todos los campos y organismos. Esta alternativa es la más factible cuando la obtención de mutantes nulos es difícil o en los casos en los que se quiera silenciar varios genes pertenecientes a una misma familia génica.

Por este motivo, y para ampliar el conjunto de herramientas genómicas disponibles para *P. digitatum*, se han construido dos nuevos plásmidos con esta finalidad: pKMP1 y pKMP2 (Figura 25). Ambos plásmidos parten del mismo plásmido base pJK4 (Fitzgerald, 2003). pKMP1 es un plásmido binario que tiene higromicina como marcador de selección. La comprobación de la construcción se realizó mediante secuenciación, digestión con HindIII y XhoI que sólo tiene un punto de corte en el plásmido y PCR estándar con los oligonucleótidos utilizados en la construcción.

El plásmido pKMP2 al igual que pKMP1 es un plásmido binario pero que como marcador de selección de transformantes posee fleomicina, en lugar de higromicina, que, como con el plásmido pRF-HU2Fle anteriormente descrito, fue obtenido desde el plásmido pUG66. La construcción se comprobó igualmente mediante secuenciación y digestión con HindIII y XhoI esperando dos fragmentos de 6,8 Kb y 1,2 Kb (Figura 25).



**Figura 25.** Representación esquemática de los plásmidos pKMP1 y pKMP2. HigromicinaR: gen de resistencia a higromicina. FleomicinaR: gen de resistencia a fleomicina. Ptef-1: Promotor de *TEF2* de *Ashbya gossypii*. Ttef-1: terminador de *TEF2* de *Ashbya gossypii*. TgpdA: Terminador de *gpdA* de *F. oxysporum*. CloranfenicolR: gen de resistencia a cloranfenicol. LB: *left border*. RB: *right border*. pBR322 ori: origen de replicación de *E. coli*.

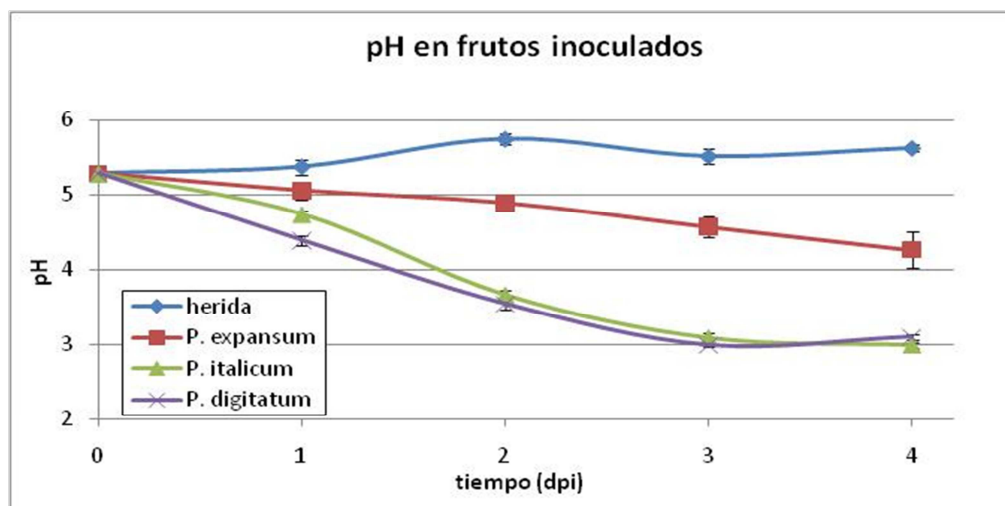
pJK11 consiste en un vector de fondo de pBluescript II conteniendo el promotor del gen *gpdA* de *G. cingulata* y el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* separados por sitios únicos de restricción EcoRI y HindIII, donde se clonan las repeticiones invertidas del gen de interés. Éstas son creadas a partir de las regiones codificantes de los genes mediante PCR y diseñando los oligonucleótidos para crear una región bucle en la hebra sentido. Los fragmentos sentido y antisentido de cada gen son ligados en el vector pJK11 previamente digerido con EcoRI y HindIII. Este casete de expresión es entonces digerido con las enzimas de restricción SacI y XhoI y clonados en pKMP1 o pKMP2, según el marcador de selección que quiera emplearse, previamente digeridos con SacI y XhoI. pKMP1 y pKMP2 son ya vectores binarios que pueden ser introducidos en *A. tumefaciens* para la transformación de *P. digitatum*.

## 2. Factor de transcripción PacC

Una característica que comparten las tres principales especies de *Penicillium* patógenas de frutos (*P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*, las dos primeras son patógenas de cítricos y la última de frutos de pepita) es que acidifican el tejido del fruto durante el desarrollo de la infección. El tejido de naranja infectado por *P. italicum* tiene un pH 1,9 unidades inferior al del tejido sano (Barmore y Brown, 1979). En la actualidad la hipótesis más extendida es que el patógeno modifica localmente el pH del huésped con el fin de que las actividades enzimáticas responsables de la degradación de la pared celular vegetal se encuentren en un pH cercano a su pH óptimo, o en el que la secreción de las mismas sea más efectiva (Prusky *et al.* 2004).

Se han realizado experimentos en los que se ha medido el pH en frutos cítricos en el punto de inoculación hasta los 4 días post-inoculación (dpi) con las tres principales especies de *Penicillium* (*P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*) y un control sin inóculo solamente realizando la herida. Como se aprecia en la Figura 26, la infección de frutos cítricos por *P.*

*digitatum* y *P. italicum* está acompañada de una fuerte acidificación del tejido desde el primer día tras la inoculación, alcanzándose descensos de hasta dos unidades de pH. Cuando se inocula *P. expansum* el descenso que se produce es menor y más tardío, disminuyendo en una unidad de pH a los 4 dpi, mientras que en control de herida no se observa variación alguna.



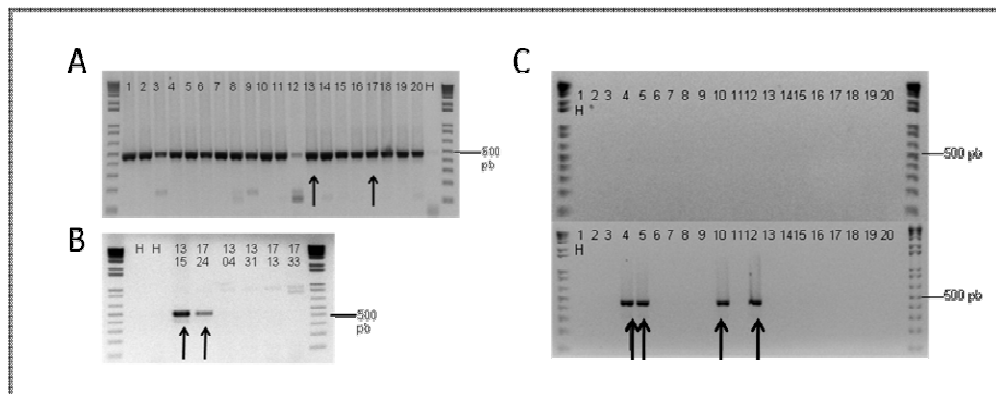
**Figura 26.** Evolución del pH en heridas de frutos de naranja inoculados con *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*.

### **2.1 Clonación y secuenciación del gen *pacC* de *P. digitatum***

De forma previa a este trabajo, en nuestro grupo se obtuvo un fragmento de 662 pb del gen *pacC* de *P. digitatum* mediante PCR, empleando oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas PacC de otros hongos filogenéticamente próximos. Este fue el primer paso en la obtención de una sonda para realizar el escrutinio de la genoteca de DNA genómico (PD1G) para obtener la secuencia completa del gen.

A continuación, se llevó a cabo el escrutinio de la genoteca de DNA genómico (PD1G) construida en el fósforo pCC2FOS con los oligonucleótidos PDPACA1 y PDPACS1 (Tabla 6 en Materiales y Métodos). Se realizaron extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala por ebullición para los 20 primeros tubos de la genoteca, cada tubo conteniendo aproximadamente unos 500 clones, para obtener el DNA de los mismos y mediante una PCR con los oligonucleótidos diseñados se obtuvo el amplicón esperado en todos los tubos menos en uno de ellos (Figura 27A). De los 20 tubos se seleccionaron dos de ellos (13 y 17), los cuales se sembraron para obtener colonias aisladas y se realizó un segundo escrutinio mediante PCR en placa de 96 pocillos donde cada pocillo contenía biomasa de 12 colonias. Para cada uno de los dos tubos seleccionados se analizaron un total de 540 colonias (45 pocillos por cada tubo). De esta PCR se identificaron varios pocillos positivos, de los que se

seleccionaron uno positivo de cada tubo inicial (13-15 y 17-24), que se sembraron para aislar colonias (Figura 27B). De las colonias obtenidas se realizó una tercera ronda de PCR empleando esta vez colonias individuales. Se analizaron 20 colonias por cada uno de los dos tubos positivos seleccionados. De esta última PCR se obtuvieron 4 clones positivos (17-24-4, 17-24-5, 17-24-10 y 17-24-12) (Figura 27C).



**Figura 27.** Escrutinio de la genoteca de DNA genómico para clonar el gen *pacC* de *P. digitatum*. A. Primera fase de escrutinio: PCR de las extracciones de DNA plasmídico de los 20 primeros tubos de la genoteca PD1G. B. Segunda fase de escrutinio: PCR de grupos de 12 clones obtenidos a partir de los tubos 13 y 17. C. Tercera fase de escrutinio: PCR de 20 colonias individuales de los tubos positivos 13-15 (parte superior) y 17-24 (parte inferior). Como H se representan los controles negativos de PCR.

Se seleccionó el clon 17-24-4 y se realizó extracción del DNA del fósido (tal y como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos). El DNA del fósido obtenido se empleó directamente para secuenciar todo el gen así como su promotor y terminador. La secuenciación se realizó en ambas hebras para evitar posibles errores, partiendo de oligonucleótidos diseñados según la secuencia obtenida en las reacciones de secuenciación previas. En total, se secuenciaron 5966 pb de las cuales 1984 pb correspondieron a la secuencia completa del gen *pacC* (Figura 28), 2631 pb correspondieron al promotor, en el cual se identificó un gen que presumiblemente codifica una oxigenasa dependiente de oxoglutarato y hierro, y 1351 pb al terminador. Comparando la secuencia con la depositada recientemente en el NCBI para Pd1 (PDIP\_75300), la identidad fue del 99 % con tres nucleótidos diferentes entre las secuencias. Idénticos resultados se obtuvieron al comparar la secuencia con la del gen *pacC* (PDIG\_66000) de la otra cepa disponible de *P. digitatum* PHI26.

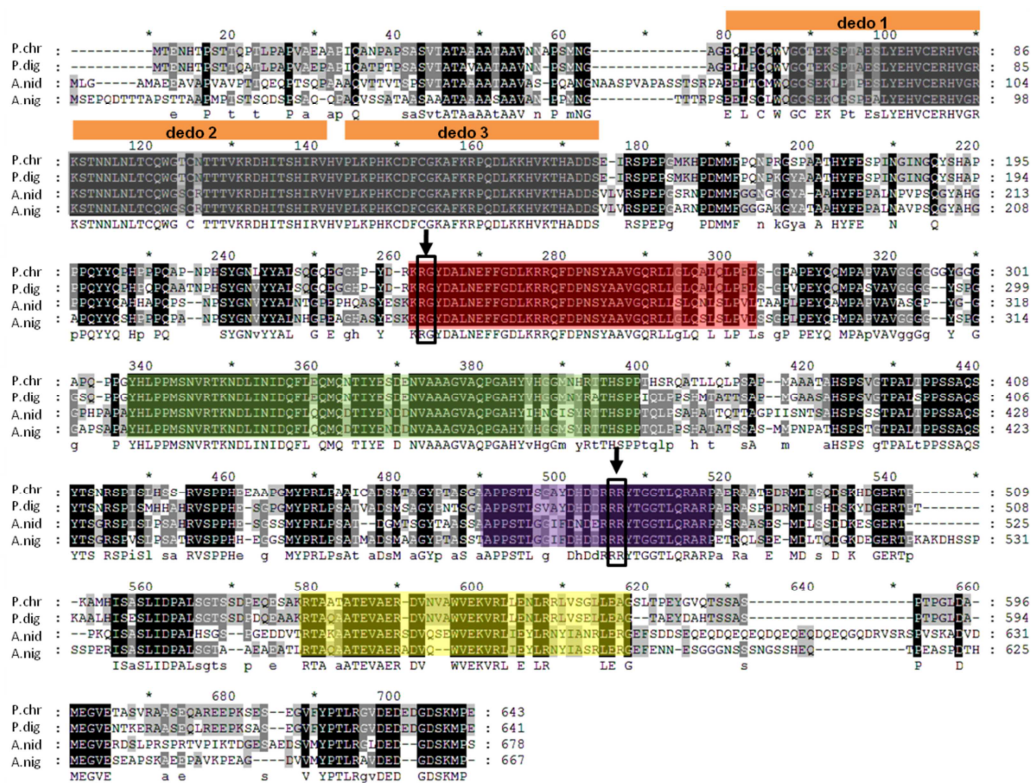


### **2.2 Análisis de la secuencia del gen *pacC* de *P. digitatum***

La secuencia del gen *pacC* tiene 1984 pb y al traducirla, teniendo en cuenta la presencia de un único intrón (nt 226-284), se obtuvo una secuencia de 641 aminoácidos. El peso molecular teórico es de 69,13 kDa y su punto isoeléctrico teórico de 5,98.

La secuencia de la proteína PacC se comparó con las secuencias deducidas de la misma proteína de otros hongos filamentosos, como son *P. chrysogenum*, *A. niger* y *A. nidulans*. En la figura 29 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PacC realizado con el programa *ClustalX*.

En dicho alineamiento se observa que la proteína PacC de *P. digitatum* presenta los dominios que están conservados en las demás proteínas PacC de otros hongos filamentosos y que son los que le confieren la funcionalidad. Estos dominios son tres regiones (A, B y C) implicadas en las interacciones intramoleculares y en el plegamiento de la proteína, 2 regiones en las que se sitúan las señales para sendos cortes proteolíticos que originan la forma activa de la proteína, así como tres motivos denominados dedos de cinc Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>. Los dedos de cinc son pequeños motivos estructurales de proteínas que pueden coordinar uno o más iones de cinc para ayudar a estabilizar sus pliegues, coordinan iones de cinc con una combinación de residuos de cisteína e histidina. En el factor de transcripción PacC sólo los dedos dos y tres contactan directamente con el sitio de unión a DNA (secuencia consenso 5'-GCCARG) y mediante modelado y analogía, se conoce que el dedo uno interactúa con el segundo dedo (Peñalva *et al.* 2008).



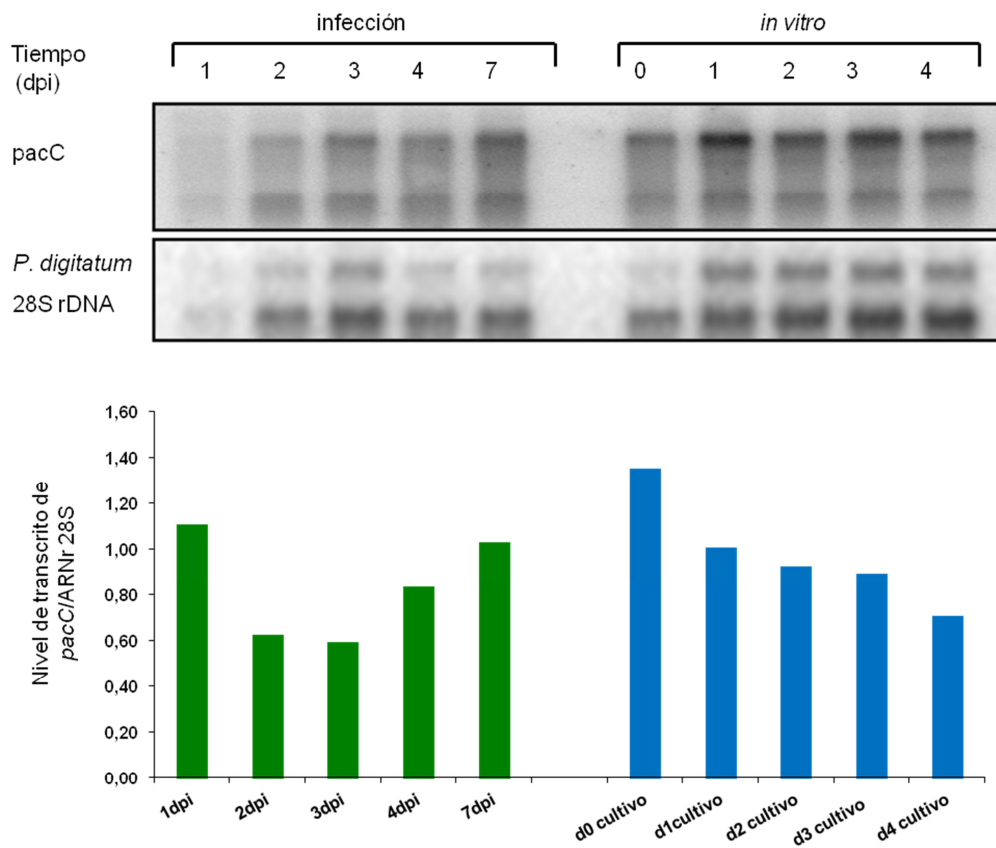
**Figura 29.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del factor de transcripción PacC de *P. digitatum* (P.dig) con las descritas en otros hongos filamentosos: *A. nidulans* (A.nid) número de acceso GenBank: CAA67063.1; *P. chrysogenum* (P.chr) número de acceso GenBank: AAC36492.1 y *A. niger* (A.nig) número de acceso GenBank: CAK37752.1. Las 5 regiones conservadas descritas en la bibliografía aparecen marcadas en recuadros de diferentes colores. En gris se marca la región de los 3 dedos de cinc C2H2 y en naranja cada uno de ellos; en rojo, verde y amarillo las regiones A, B y C respectivamente y en morado la región donde se produce el primer corte proteolítico. La flecha indica el lugar donde tienen lugar los dos cortes proteolíticos que producen la forma activa de la proteína. El alineamiento se llevó a cabo con el programa ClustalX.

### 2.3 Análisis de expresión de *pacC*

El patrón de expresión del gen *pacC* se analizó mediante hibridación Northern. Se realizaron extracciones de RNA total a partir de los micelios liofilizados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas. En la primera se partió de RNA total extraído de micelio de *P. digitatum* crecido en medio PDB a 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días con la finalidad de conocer la expresión *in vitro* de *pacC*. En la segunda condición se extrajo RNA de tejido de frutos de naranja infectados con una suspensión de  $10^6$  conidios/mL de *P. digitatum* a los 1, 2, 3, 4 y 7 días tras la inoculación. La normalización de todas las señales se llevó a cabo con la señal de la hibridación con una sonda correspondiente al 28S rDNA de *P. digitatum*.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 30. Se puede observar que el gen *pacC* no se induce ni durante el proceso de infección ni durante el crecimiento en medio PDB. La

presencia de dos bandas en la hibridación Northern podría indicar la presencia de dos transcritos cuyos orígenes pueden obedecer a distintos motivos. Sin embargo es de reseñar que en otros hongos filamentosos el gen *pacC* está en copia única y los datos recientes de la secuenciación del genoma de dos aislados indican que en *P. digitatum* sólo existe una copia de *pacC*.



**Figura 30.** Análisis Northern del patrón de expresión del gen *pacC*. El nivel de transcrito fue cuantificado y normalizado respecto a la sonda 28S rDNA de *P. digitatum*. El análisis se realizó a los 1, 2, 3, 4 y 7 días posteriores a la infección (dpi) de los frutos de naranja con *P. digitatum* (infección), así como a los 0, 1, 2, 3 y 4 días de incubación en medio PDB (*in vitro*) de *P. digitatum*.

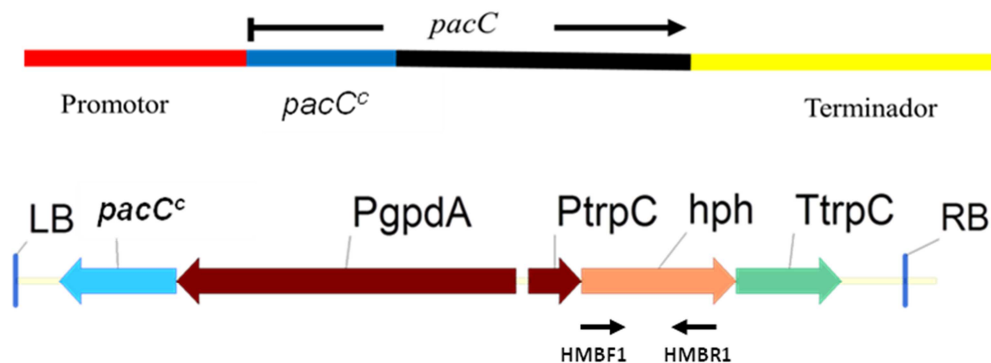


#### **2.4 Obtención de mutantes *pacC* de *P. digitatum***

Con el fin de profundizar en el posible papel que desempeña este factor de transcripción durante el proceso de infección, el siguiente paso de este trabajo fue la obtención de mutantes que expresasen una variante de la proteína truncada por el segundo sitio de corte proteolítico, de forma que la proteína sintetizada sea funcionalmente activa independientemente del pH. Hemos abordado dos aproximaciones. En la primera, se pretende obtener una expresión constitutiva de una versión truncada del gen bajo el control del promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans*. Esta fusión se integraría de forma ectópica en el genoma, de forma que los transformantes obtenidos serían merodiploides. En la segunda aproximación se pretende substituir el gen *pacC* original por una copia truncada del mismo mediante recombinación homóloga.

##### **2.4.1 Construcción del plásmido de sobreexpresión pRF-HUE-pacC<sup>c</sup>**

Con la finalidad de conocer mejor el efecto del factor de transcripción PacC se construyó el plásmido pRF-HUE-pacC<sup>c</sup> (Figura 31), que deriva del vector pRF-HUE (Frandsen *et al.* 2008). Este vector contiene el casete de higromicina como marcador de selección. Además, contiene el promotor del gen que codifica la gliceraldehido 3 deshidrogenasa de *A. nidulans* (*PgpdA*) tras el cual se clonó un fragmento de 1447 bp del gen *pacC* amplificado con los oligonucleótidos PACC-03 y PACC-C2S (Tabla 3 en Materiales y Métodos). El oligonucleótido PACC-03 introduce el codón ATG de inicio de la proteína. El oligonucleótido PACC-C2S cambia la arginina de la posición 472 de la proteína por el codón de parada TGA. A pesar de que el segundo corte proteolítico que produce la forma final y activa de la proteína tiene lugar en el residuo 237Y, los trabajos realizados con otros hongos filamentosos han demostrado que para conseguir una forma activa de la proteína se necesitan tanto la región A y B de la misma para que puedan interactuar con el DNA. Por esta razón se diseñó el oligonucleótido PACC-C2S, para establecer el codón de parada dentro de la “caja” de la segunda señal de corte proteolítico, en el mismo residuo de arginina empleado en estudios previos en *A. nidulans* (Tilburn, 1995), *F. oxysporum* (Caracuel *et al.* 2003) y *Wangiella dermatitidis* (Wang y Szanislo, 2009). La amplificación del fragmento se llevó a cabo con una DNA polimerasa que posee actividad de corrección de lectura (PfuTurbo Hotstart, Stratagene) para asegurar la fidelidad de la copia amplificada, que fue confirmada mediante secuenciación. Este fragmento se clonó en el vector pRF-HUE siguiendo la metodología USER descrita en Materiales y Métodos. Para comprobar que la incorporación de la copia truncada del gen *pacC* se había producido correctamente se secuenció el plásmido con los oligonucleótidos RF3, que se encuentra dentro del casete de resistencia a higromicina, y el oligonucleótido PACC-C2S, que está situado en uno de los extremos del fragmento que se ha utilizado para la clonación.



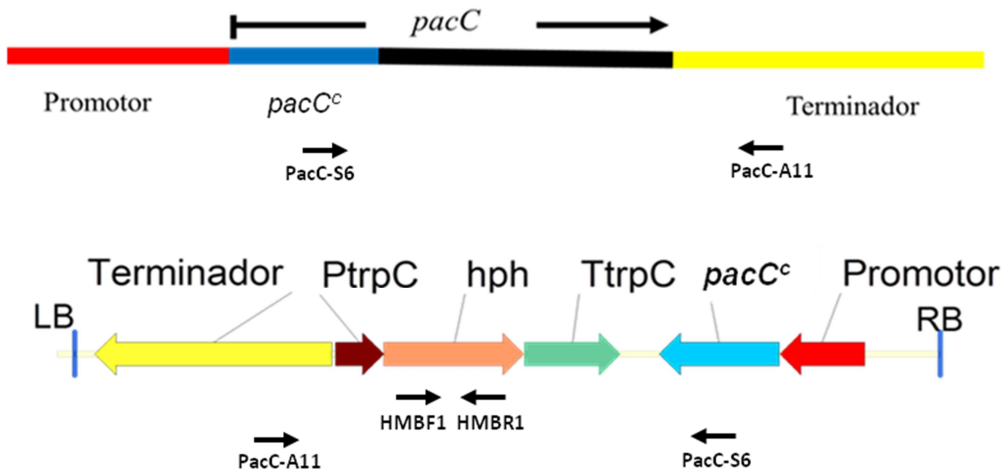
**Figura 31.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HUE-*pacC*<sup>c</sup>. LB: *left border*. RB: *right border*. *pacC*: secuencia del factor de transcripción *pacC* de *P. digitatum* que codifica los 472 primeros aminoácidos de la proteína introduciendo un codón de parada en la última posición. *PgpdA*: promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans*. *hph*: gen de resistencia a higromicina. *PtrpC*: promotor del gen *trpC* de *A. nidulans*. *TtrpC*: terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. *pacC*<sup>c</sup>: proteína funcional. HMBF1 y HMBR1: oligonucleótidos que amplifican el gen de resistencia a higromicina.

#### **2.4.2 Construcción del plásmido de expresión constitutiva pRF-HU2-*pacC*<sup>c</sup>**

Para la expresión constitutiva del factor de transcripción PacC se construyó el plásmido pRF-HU2-*pacC*<sup>c</sup> (Figura 32), que deriva del vector pRF-HU2 (Frandsen *et al.* 2008) y que contiene como marcador de selección el gen de resistencia a higromicina flanqueado por el promotor y terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. Flanqueando al casete de higromicina hay un fragmento de 1620 pb del terminador de gen *pacC*, amplificado con los oligonucleótidos PACC-A3 y PACC-D4 (Tabla 7 en Materiales y Métodos) y 1674 pb que incluyen 258 pb de promotor y 1416 pb del extremo 5' del gen, correspondientes a los 472 primeros aminoácidos de la proteína, amplificados con los oligonucleótidos PACC-C1 y PACC-C2S (Tabla 3). Este fragmento se amplificó con una DNA polimerasa (PfuTurbo Hotstart, Stratagene) con actividad correctora de lectura para asegurar la fidelidad de la copia amplificada. Tanto el casete de higromicina como los fragmentos derivados de la secuencia de *pacC* se encuentran situados entre los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del T-DNA que se integrará en el genoma del hongo por recombinación homóloga, facilitando así que se produzca la forma activa de la proteína PacC de forma constitutiva sin tener que depender del control del pH.

La clonación de ambos fragmentos y la comprobación del plásmido resultante se llevaron a cabo con la misma metodología explicada en el apartado anterior. Para la comprobación de uno de los lados se amplificó un fragmento de 1787 pb con los oligonucleótidos PACC-C1 y RF2. El oligonucleótido PACC-C1 se encuentra en uno de los extremos del fragmento introducido y el oligonucleótido RF2 se encuentra situado en el casete de resistencia a higromicina. A las colonias positivas se les realizó la comprobación del otro lado de la

construcción mediante los oligonucleótidos PACC-D4 y RF1 que amplifican un fragmento de 2262 pb. Una vez seleccionados varios clones positivos, se emplearon los mismos cuatro oligonucleótidos citados anteriormente para secuenciar los puntos de fusión y comprobar que no se habían introducido errores durante el proceso de clonación.



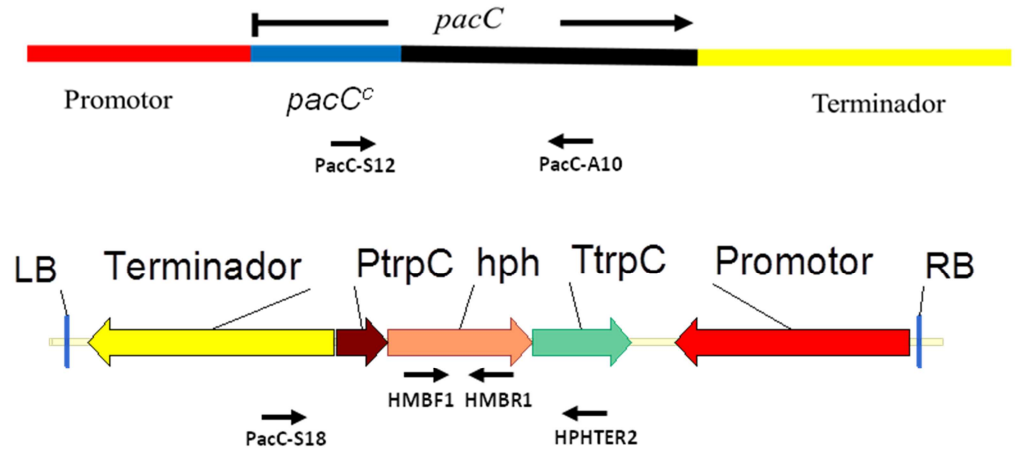
**Figura 32.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2-*pacC<sup>c</sup>*. LB: left border. RB: right border. *pacC*: secuencia del factor de transcripción *pacC* de *P. digitatum* que codifica los 472 primeros aminoácidos de la proteína introduciendo un codón de parada en la última posición. Promotor: 258 pb del promotor de *pacC*, Terminador: 1620 pb del terminador de gen *pacC*. *hph*: gen de resistencia a higromicina. *PtrpC*: promotor del gen *trpC* de *A. nidulans*. *TtrpC*: terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. *pacC<sup>c</sup>*: proteína funcional. HMBF1 y HMBR1: oligonucleótidos que amplifican el gen de resistencia a higromicina. PacC-S6 y PacC-A11: oligonucleótidos utilizados para diferenciar entre los transformantes en los que se produjo la recombinación homóloga de los que aún conservan la copia del gen.

### 2.4.3 Construcción del plásmido de delección pRF-HU2- $\Delta$ *pacC1*

Para la delección de *pacC* se construyeron dos plásmidos que diferían en la longitud de los fragmentos que flanqueaban al casete de higromicina. El primer plásmido, denominado pRF-HU2- $\Delta$ *pacC1* (Figura 33), contiene el casete de higromicina flanqueado por un fragmento de 1091 pb del terminador de gen *pacC*, amplificados con los oligonucleótidos PACC A3 y PACC A4 (Tabla 7), y otro fragmento que contiene 1013 pb de la zona del promotor del gen *pacC*, que se obtuvo con los oligonucleótidos PACC 01 y PACC 02 (Tabla 3). La metodología empleada fue la misma descrita anteriormente. La integración del T-DNA en el genoma del hongo por recombinación homóloga eliminará el gen *pacC* en el genoma del hongo, sustituyéndolo por el casete de resistencia a higromicina.

Para la comprobación de la clonación se emplearon los oligonucleótidos PACC-O1 y RF2, que amplifican un fragmento de 1174 pb correspondiente a la región del promotor y los

oligonucleótidos PACC-A4 y RF1, que amplifican un fragmento de 1246 pb de la región del terminador. Estos mismos cuatro oligonucleótidos se emplearon para comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores y artefactos de clonación.

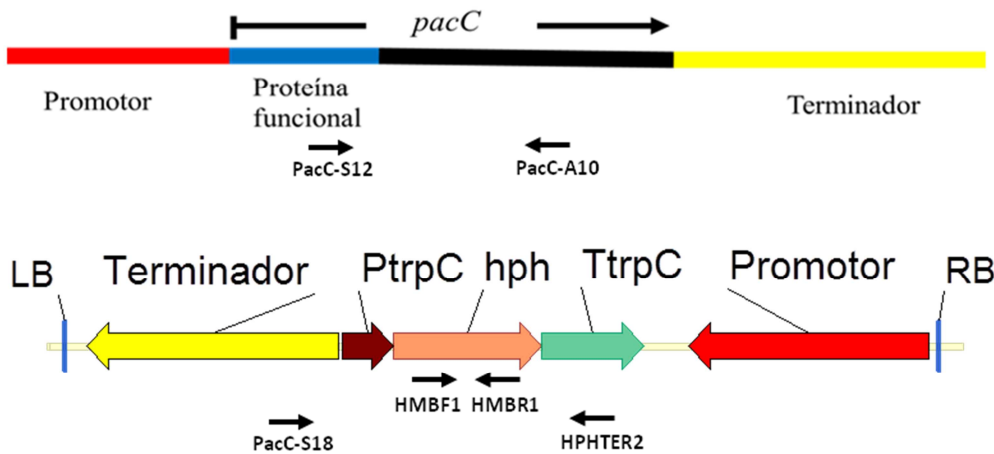


**Figura 33.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2- $\Delta$ pacC1. LB: *left border*. RB: *right border*. Promotor: 1013 pb del promotor del gen *pacC*. Terminador: 1091 pb del terminador de gen *pacC*. *hph*: gen de resistencia a higromicina. *PtrpC*: promotor del gen *trpC* de *A. nidulans*. *TtrpC*: terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. *pacC<sup>c</sup>*: proteína funcional. HMBF1 y HMBR1: oligonucleótidos que amplifican el gen de resistencia a higromicina. PacC-S12 y PacC-A10: oligonucleótidos que amplifican dentro del mismo gen *pacC*. PacC-S18 y HPHTER2: oligonucleótidos para comprobar si la construcción se integró en el locus de *pacC*.

#### 2.4.4 Construcción del plásmido de delección pRF-HU2- $\Delta$ pacC2

La segunda construcción se denominó pRF-HU2- $\Delta$ pacC2 (Figura 34). La necesidad de realizar esta segunda construcción fue debida a que con 1 kb de longitud de las regiones flanqueantes del plásmido pRF-HU2- $\Delta$ pacC1 no se obtuvo ningún transformante. Sin embargo en la búsqueda de una alternativa para aumentar el nivel de recombinación homóloga como fue la utilización de mutantes deletantes en *ku80* se descubrió que al aumentar la longitud de las regiones flanqueantes desde 1 kb a 1,5 kb el porcentaje de recombinación aumentaba en gran medida. La construcción pRF-HU2- $\Delta$ pacC2 deriva también del vector pRF-HU2 (Frandsen *et al.* 2008) y contiene igualmente el casete de higromicina flanqueado por un fragmento de 1620 pb del terminador de gen *pacC*, amplificados con los oligonucleótidos PACC-A3 y PACC-D4 (Tabla 3). El otro fragmento contenía 1798 pb de la zona del promotor del gen *pacC* que se obtuvo con los oligonucleótidos PACC D1 y PACC O2 (Tabla 3).

Para la comprobación de la clonación se emplearon los oligonucleótidos PACC-D1 y RF2, que amplifican un fragmento de 1911 pb correspondiente a la región del promotor y los oligonucleótidos PACC-D4 y RF1, que amplifican un fragmento de 2262 pb de la región del terminador. Del mismo modo que con la construcción anterior se secuenció la zona de unión de los fragmentos con el plásmido para comprobar la correcta ligación y orientación de los fragmentos.



**Figura 34.** Representación esquemática de la construcción vector pRF-HU2-ΔpacC2. LB: *left border*. RB: *right border*. Promotor: 1798 pb del promotor de *pacC*. Terminador: 1620 pb del terminador de gen *pacC*. *hph*: gen de resistencia a higromicina. *PtrpC*: promotor del gen *trpC* de *A. nidulans*. *TtrpC*: terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. HMBF1 y HMBR1: oligonucleótidos que amplifican el gen de resistencia a higromicina. PacC-S12 y PacC-A10: oligonucleótidos que amplifican dentro del mismo gen *pacC*. PacC-S18 y HPHTER2: oligonucleótidos para comprobar si la construcción se integró en el locus de *pacC*.

### **2.5 Transformación de *P. digitatum* con los plásmidos pRF-HU2-pac<sup>C</sup>, pRF-HU2-ΔpacC y pRF-HUE-pac<sup>C</sup>**

La transformación del aislado de *P. digitatum* Pd1 con las diferentes construcciones se llevó a cabo empleando *A. tumefaciens* como se indica en el apartado 10 de Materiales y Métodos. La selección de transformantes se hizo en placas de PDA suplementado con higromicina. Los transformantes obtenidos se analizaron por PCR.

A los presuntos transformantes que poseían la construcción con el plásmido pRF-HUE-pac<sup>C</sup>, para la sobreexpresión del factor de transcripción PacC, se les analizó únicamente la presencia del gen de resistencia a higromicina, cuya presencia indica que los transformantes habían integrado la construcción en su genoma. El análisis se llevó a cabo mediante PCR con los oligonucleótidos HMBF1 (3' CTG ATA GAG TTG GTC AAG ACC 5') y HMBR1 (3' CTG TCG

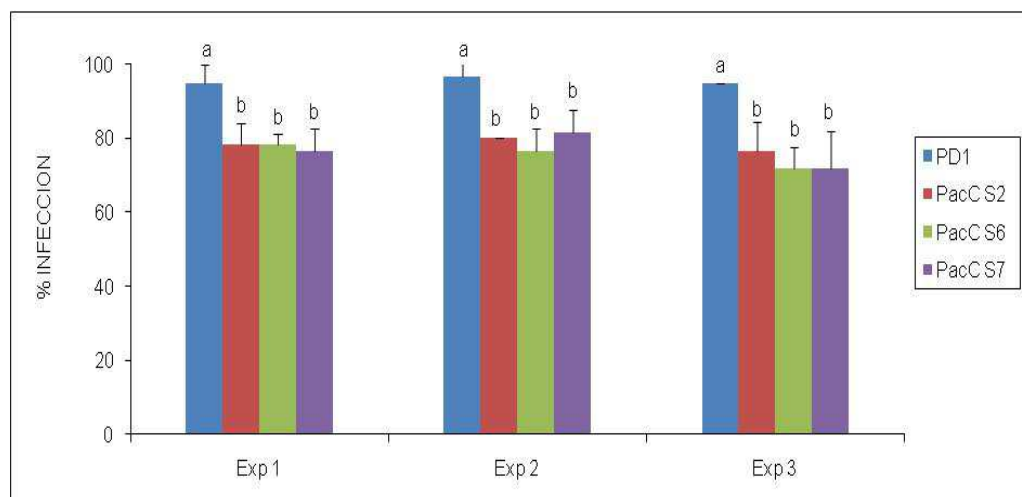
AGA AGT TTC TGA TCG 5') que amplifican un fragmento de 800 pb del gen de resistencia a higromicina. Todos los transformantes analizados fueron positivos.

Para el análisis de los transformantes que contenían las construcciones de los plásmidos de delección pRF-HU2- $\Delta$ pacC1 y pRF-HU2- $\Delta$ pacC2 se utilizaron las parejas de oligonucleótidos PACCS18-HPHTER2 y PACCS12-PACCA10. La primera pareja de oligonucleótidos amplifica si la construcción se integró en el locus de *pacC* mientras que la segunda amplifica dentro del mismo gen *pacC*. Para la primera construcción se analizaron más de 500 presuntos transformantes y no se obtuvo ningún mutante de delección. Respecto a la segunda construcción pRF-HU2- $\Delta$ pacC2, del mismo modo, de más de 250 presuntos transformantes analizados tampoco se obtuvo ningún mutante de delección, aunque algunos dieron positivo para la primera pareja de oligonucleótidos, la segunda pareja siempre dio positivo para todos los transformantes lo que indica que todos conservan una copia intacta de *pacC*.

Para el análisis de los transformantes que contenían la construcción del plásmido de expresión constitutiva pRF-HU2-pacC<sup>c</sup> se utilizó la pareja de oligonucleótidos PACCS6-PACCA11. El tamaño del amplicón diferencia los transformantes en los que se produjo la recombinación homóloga, en los cuales resulta de un tamaño de 3600 pb, de los transformantes que aún conservan la copia original del gen, que es de 1255 pb. Al igual que en el caso anterior del análisis de más 100 presuntos transformantes no se obtuvo ningún mutante de expresión constitutiva.

#### **2.5.1 Ensayos de infección transformantes de PacC**

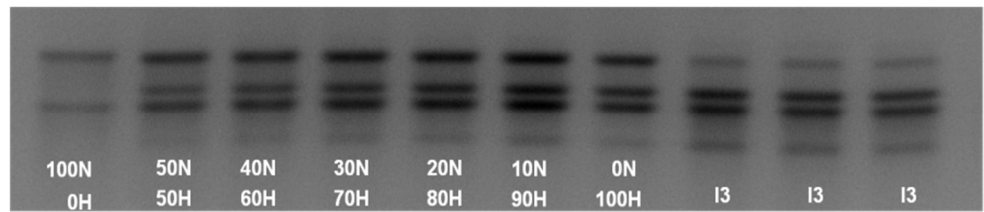
Una vez se comprobó la presencia del T-DNA transformante en el genoma de los transformantes de sobreexpresión, se seleccionaron 3 de ellos (PacC S2, PacC S6 y PacC S7) para comprobar si la capacidad infectiva de los mismos se había visto afectada. Estos mutantes deberían expresar constitutivamente la forma activa del factor de transcripción PacC independientemente del pH del medio, inhibiendo la expresión de los genes que se expresan en condiciones ácidas. Se realizaron 3 ensayos de infección independientes en frutos de naranja "Lane Late" con conidios de los transformantes de *P. digitatum* a una concentración de  $10^4$  conidios/mL. A los 5 días tras la inoculación se realizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD (Figura 35). Los resultados reflejan que en los tres transformantes la capacidad infectiva se vió afectada, produciéndose una disminución de la infección con respecto al control de un 20 %. Por lo tanto, se comprueba la importancia del pH en el proceso de infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja.



**Figura 35.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja “Lane Late” inoculados con de transformantes de *P. digitatum* que expresan constitutivamente el factor de transcripción PacC. Los resultados se presentan para 5 dpi como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD para cada transformante y experimento. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Muestras con distintas letras dentro de cada experimento fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

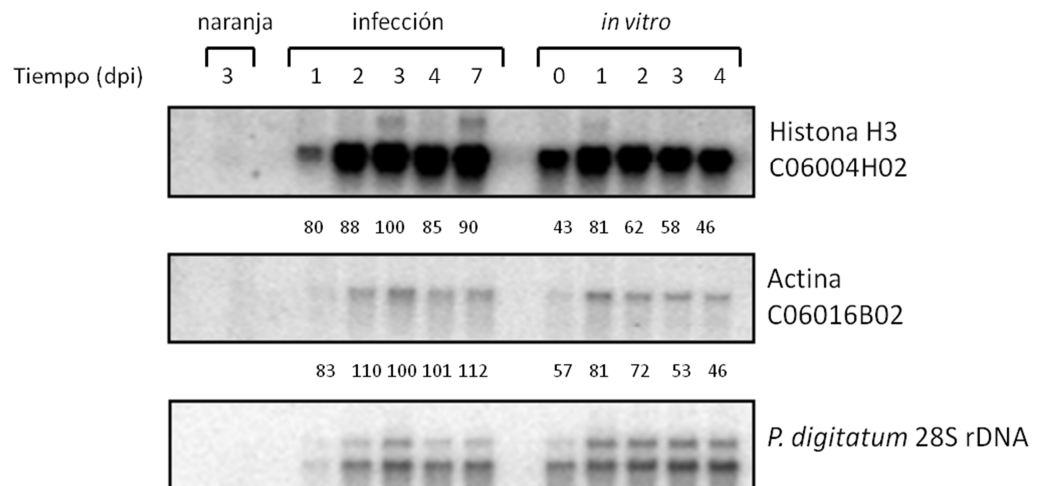
### **3. Identificación y caracterización de genes de *P. digitatum* que se inducen durante el proceso de infección de frutos cítricos**

Para la identificación y caracterización de genes de *P. digitatum* que se inducen durante el proceso de infección se construyó una genoteca de cDNA sintetizado a partir de RNA aislado de tejido de naranja infectado con *P. digitatum* usando el método de la hibridación sustractiva mediada por PCR supresiva (SSH). El tejido infectado fue recogido a las 72 horas tras la inoculación, cuando la maceración del tejido es ya evidente. Para la estimación de las proporciones tanto de hongo como de tejido de naranja a emplear en la muestra “driver” se analizaron mezclas de diferentes proporciones de ambos RNAs comparándolas con una muestra de RNA de tejido de naranja infectado a los 3 días después de la inoculación (Figura 36). La proporción estimada para la muestra “driver” fue de 90 % de RNA de hongo y 10 % de RNA de tejido del fruto.



**Figura 36.** Comparación de diferentes proporciones de RNA de hongo (H) y naranja (N) con RNA de tejido de naranja infectado a los 3 días tras la inoculación (I3).

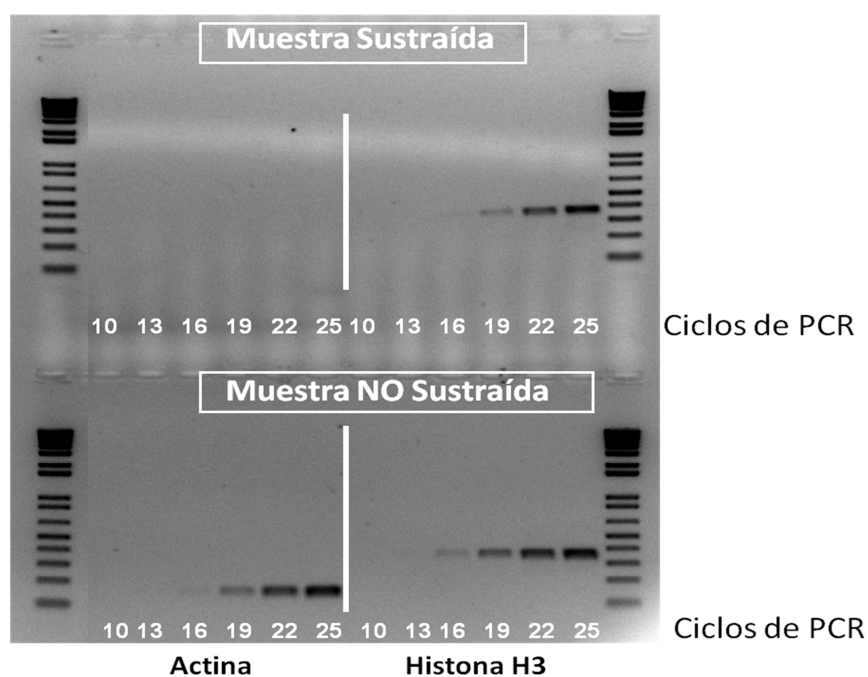
Para construir la genoteca sustractiva de cDNA se usó como muestra “driver” una mezcla de RNAs de tejido de fruto no infectado y de hongo crecido *in vitro* en las proporciones estimadas anteriormente y como muestra “tester” tejido de fruto infectado a los 3 dpi. La comprobación de que el proceso de sustracción había sido eficiente se llevó a cabo mediante PCR con los genes que codifican una proteína similar a actina y la histona H3 (Figura 37), que ya habían sido aislados previamente en el grupo (González-Candelas *et al.* 2010).



**Figura 37.** Hibridaciones Northern de los genes seleccionados para comprobar la eficiencia del proceso de sustracción. Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes que presentan homología con la histona H3 (*his3*, C06004H02) y con actina (*act*, C06016B02). Para cada uno de los genes analizados, la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto a la sonda 28S rDNA de *P. digitatum*. Al pie de cada panel se muestra la cuantificación relativa de la correspondiente señal referida al valor de la muestra de infección a día 3. El análisis se realizó a los 1, 2, 3, 4 y 7 días posteriores a la infección de los frutos de naranja con *P. digitatum* (infección), así como a los 0, 1, 2, 3 y 4 días de incubación en medio PDB (*in vitro*) de *P. digitatum*. Como control negativo se utilizó RNA de fruto a los 3 días después de practicar la herida.



Como puede observarse en la Figura 37, estos dos genes presentan una expresión constitutiva durante la infección de frutos de naranja. Se analizó por PCR semicuantitativa la abundancia relativa de estos dos genes en el cDNA obtenido tras el proceso de sustracción y se comparó con su abundancia en un control de cDNA no sustraído. Como se muestra en la Figura 38, la aparición del amplicón correspondiente al gen de actina en el control no sustraído se observa a partir del ciclo 16, mientras que en el cDNA sustraído no se observa amplicón, incluso después de 25 ciclos. Según los análisis Northern, el gen que codifica la histona H3 tiene una expresión mayor que el gen que codifica la actina (Figura 37). Por ello la sustracción del gen de la histona H3 fue mucho menos eficiente que en el caso anterior, observándose sólo un ligero retraso en la aparición del amplicón (Figura 38). Estos resultados confirman que la sustracción ha tenido lugar, pero que la eficiencia de la misma depende del nivel de expresión de cada gen. Una vez comprobado que la sustracción había tenido lugar se procedió a clonar los fragmentos de cDNA en el plásmido pCRII, obteniéndose una genoteca sustractiva, que se denominó PDS.



**Figura 38.** Comprobación de la eficiencia de la sustracción. Muestras de PCR obtenidas a diferentes ciclos tanto del cDNA sustraído como del cDNA control no sustraído para los dos genes utilizados como control, Histona H3 (*his3*, C06004H02) y Actina (*act*, C06016B02).

### **3.1 Secuenciación y análisis de las secuencias de clones de la genoteca PDS**

Se seleccionaron aleatoriamente 328 clones de la genoteca PDS para su secuenciación, de los cuales 33 fueron descartados (27 secuencias malas y 6 secuencias sin inserto). El análisis de los agrupamientos de secuencias se llevó a cabo con el programa SEQtools (<http://seqtools.dk>). De los 295 clones válidos se obtuvieron 149 unigenes, lo que supone el 51 % del total de secuencias válidas, por lo que la redundancia final en la genoteca PDS fue del 49 %. Los 149 unigenes están formados por 98 secuencias únicas y 51 agrupamientos, que incluyen 197 ESTs (Tabla 12). El tamaño medio de los insertos es de 290 pb, próximo al valor teórico de 256 pb correspondiente al tamaño esperado en función de la frecuencia de corte de la enzima RsaI empleada en la digestión del cDNA durante la construcción de la genoteca.

**Tabla 12.** Resumen de las características generales de la genoteca PDS.

<b>Resumen genoteca PDS</b>	
Clones secuenciados	328
Secuencias válidas (ESTs)	295
ESTs en agrupamientos	197
Nº total de agrupamientos	51
ESTs únicas	98
Unigenes	149
Redundancia (%)	49

Redundancia =  $(1 - (\text{Genes totales} / \text{ESTs})) \times 100$

En la tabla 13 se muestran los 23 unigenes que contienen 3 o más ESTs, que incluyen un total de 141 ESTs, lo que representa un 48 % del total de ESTs. De estos 23 agrupamientos dos de ellos tienen homología con proteínas relacionadas con el fruto, una reticulín oxidasa y una proteína de unión a DNA respectivamente (Cs2g10140.0 y Cs3g01585.1). Los 21 agrupamientos restantes proceden putativamente de *P. digitatum*. La reciente disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *P. digitatum* ha permitido asignar cada una de las ESTs al gen al que pertenecen y a su número de acceso en el NCBI. Destaca el hecho de que varios de los agrupamientos más numerosos tienen homología con diferentes tipos de proteasas, como son una endopeptidasa aspártica (PDIP\_82060), una tripeptidil peptidasa S8 (PDIP\_12220), una aspergillopepsina (PDIP\_06020) y una carboxipeptidasa (PDIP\_71590), así como otros con homología con varias enzimas degradadoras de pared celular, como una poligalacturonasa (PDIP\_64460), una endoglucanasa (PDIP\_65210) y una pectin liasa

(PDIP\_57790). También se encuentran agrupamientos relacionado con proteínas ribosomales (Proteína ribosomal 60S L9; PDIP\_41510).

Los restantes 126 genes (datos suplementarios) incluyen a 154 ESTs. Catorce de ellos corresponden a genes del fruto, como el que codifica una lipasa de clase 3 (Cs2g28830.1), dos glutatión S-transferasas (orange1.1t03455.1 y orange1.1t03630.1) o una alfa-dioxigenasa inducible por patógeno (Cs2g28680.1). El grupo más representado con 14 genes está relacionado con proteínas ribosomales. Varios genes están relacionados con la patogénesis, ya que codifican enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular, como una glucanasa (PDIP\_08210) o una pectin liasa B (PDIP\_08080), o proteasas, como una serin peptidase (PDIP\_67670). También destacan los unigenes relacionados con el transporte de sustancias, como un transportador de oligopéptidos (PDIP\_80310) y dos relacionados con mecanismos de detoxificación de la célula: un transportador MFS (PDIP\_09580) y un transportador tipo ABC (PDIP\_53810). También se encuentran unigenes relacionados con el metabolismo redox, como los que codifican una tioredoxina (PDIP\_60580), una peroxiredoxina (PDIP\_61930), una superóxido dismutasa (PDIP\_66470), una glutatión S-transferasa (PDIP\_62390) y una formato deshidrogenasa (PDIP\_18480). Y varios unigenes relacionados con la obtención de energía mediante la vía de la glucólisis, como una enolasa (PDIP\_68590) o una piruvato quinasa (PDIP\_70570). También se encuentran unigenes que codifican proteínas de la vía de la ubiquitinación, que está relacionada con la degradación de proteínas anómalas: una ubiquitina ligasa (PDIP\_66270) y una enzima de unión a ubiquitina (PDIP\_31680).

**Tabla 13.** Anotación de los genes de la genoteca sustraída de cDNA PDS que tienen más de 3 ESTs.

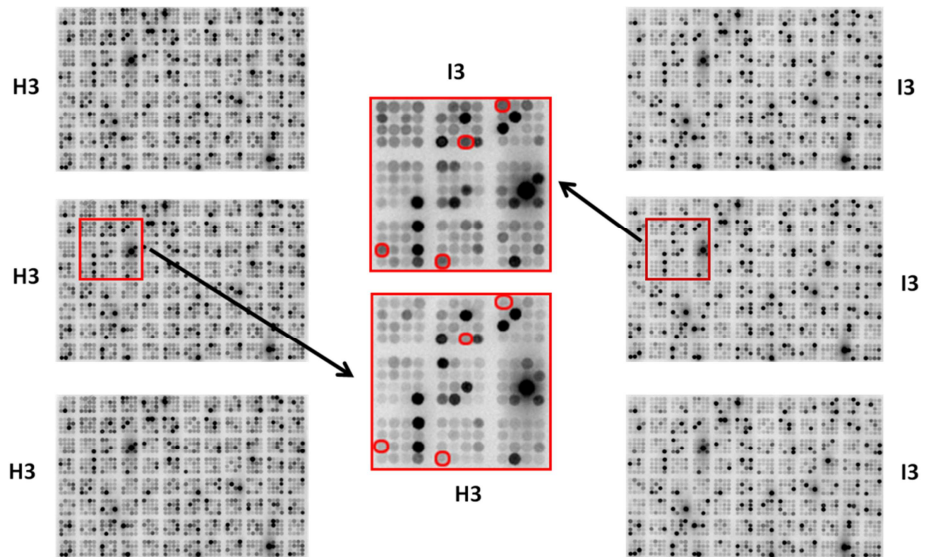
Unigen	Proteína	nº Acceso GenBank	Anotación	Origen	nº ESTs
SSH-01	PDIP_82060	EKV05607.1	Endopeptidasa aspártica pep1	<i>P. digitatum</i>	27
SSH-03	PDIP_65210	EKV09439.1	Endoglucanasa/celulasa extracelular	<i>P. digitatum</i>	11
SSH-02	PDIP_64460	EKV09364.1	Endo-poligalacturonasa	<i>P. digitatum</i>	10
SSH-07	PDIP_03330	EKV21742.1	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	9
SSH-05	PDIP_12220	EKV20850.1	Tripeptidil peptidasa S8	<i>P. digitatum</i>	8
SSH-09	mitocondria	CM001644.1	<i>Penicillium digitatum</i> Pd1 mitocondria	<i>P. digitatum</i>	7
SSH-08	PDIP_71590	EKV07879.1	Carboxipeptidasa 5	<i>P. digitatum</i>	6
SSH-10	PDIP_47870	EKV13428.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>P. digitatum</i>	6
SSH-11	PDIP_77270	EKV06691.1	Ribonucleasa guanil-específica	<i>P. digitatum</i>	6
SSH-12	Cs2g10140.1		Reticulina oxidasa	<i>C. sinensis</i>	6
SSH-04	PDIP_06020	EKV21461.1	Aspergillopepsina	<i>P. digitatum</i>	5
SSH-13	PDIP_33560	EKV16989.1	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	5
SSH-06	PDIP_45260	EKV14128.1	Proteína C inducida por concanamicina (CipC)	<i>P. digitatum</i>	4
SSH-14	PDIP_45660	EKV13970.1	Sorbitol / xilulosa reductasa	<i>P. digitatum</i>	4
SSH-16	PDIP_49840	EKV13126.1	Inhibidor de la iniciación de la traducción	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-18	PDIP_48830	EKV13195.1	Nucleósido difosfato quinasa	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-19	PDIP_49850	EKV13127.1	Giberelina 3-beta hidroxilasa	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-20	Cs3g01585.1		Proteína de unión a DNA	<i>C. sinensis</i>	3
SSH-21	PDIP_06490	EKV21440.1	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-22	PDIP_10140	EKV21060.1	Naftaleno 1,2-dioxigenasa, subunidad alfa	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-23	PDIP_41510	EKV15092.1	Proteína ribosomal 60S L9	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-24	PDIP_57790	EKV11104.1	Pectin liasa	<i>P. digitatum</i>	3
SSH-25	PDIP_64200	EKV09493.1	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada	<i>P. digitatum</i>	3

### **3.2 Análisis de expresión de los clones presente en la genoteca PDS**

La segunda aproximación genómica que se utilizó para identificar genes de *P. digitatum* que se inducen durante el proceso de infección fue la creación de una macromatriz partiendo de los clones obtenidos previamente en la genoteca PDS y la hibridación de la misma con muestras de RNAs procedentes de tejido infectado y de micelio de hongo crecido en medio de cultivo. Para la construcción de la macromatriz de cDNA se seleccionaron al azar 1440 clones individuales de la genoteca PDS. Los insertos de estos clones fueron amplificados por PCR y depositados en una membrana de nailon. También se incluyeron en la membrana 96 controles tanto positivos como negativos. El vector sin inserto fue utilizado como control negativo. Para la selección de posibles controles de expresión tanto constitutiva como diferencial se realizaron análisis Northern de varios genes de *P. digitatum* obtenidos de

genotecas previamente construidas en nuestro grupo. Como genes control se incluyeron el gen que codifica una pectin liasa (C34104G01) y el gen que codifica la histona H3 (C06004H02). Estos genes fueron obtenidos de dos bibliotecas de cDNA (RindPdig24 y PostharvP1) construidas previamente en nuestro laboratorio: RindPdig24 se obtuvo de frutos de mandarina "Clemenules" a las 24 horas después de ser heridos e infectados con *P. digitatum* (Forment *et al.* 2005), mientras que PostharvP1 se obtuvo de frutos de mandarina "Clemenules" heridos y frutos heridos e infectados con *P. digitatum* a diferentes tiempos, y está enriquecida en cDNAs de longitud completa (Marques *et al.* 2009). También fueron incluidos como controles clones de los rRNA 26-28S de *C. sinensis* y de *P. digitatum* (Figura 37), que ya habían sido clonados en el laboratorio (Ballester *et al.* 2006). Se obtuvieron 12 réplicas de la macromatriz en el Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València.

La macromatriz fue hibridada con muestras de cDNA de cadena sencilla marcadas con <sup>33</sup>P-dCTP. Se emplearon las mismas muestras a partir de las cuales se obtuvo la genoteca PDS, tejido de naranja a los 3 días de la infección (I3) y hongo crecido en medio de cultivo líquido PDB durante 3 días (H3). Se realizaron un total de 3 réplicas biológicas de cada muestra. Las señales obtenidas fueron convertidas a valores de intensidad relativa que se cuantificaron mediante el programa informático Array Vision y con el programa Array Stat se realizó el análisis estadístico de los mismos, como se indica en el apartado 11.3 de Materiales y Métodos. La comparación entre las imágenes de hibridación de ambas muestras reveló la presencia de genes que se inducían durante el proceso de infección (Figura 39).



**Figura 39.** Imágenes de la hibridación de las macromatrices generadas a partir de la genoteca PDS. I3: cDNA de tejido de naranja a los 3 días de la inoculación con *P. digitatum*. H3: cDNA de hongo crecido *in vitro* durante 3 días. En detalle se muestran 4 clones que se expresan más durante la infección. Las hibridaciones se realizaron con tres réplicas biológicas independientes.

El análisis estadístico, realizado con un intervalo confianza de 0,05, reveló un total de 867 clones con una diferencia de expresión significativa (60,2 % del total), de los cuales 741 clones, que representan un 51,5 % del total de clones representados en la macromatriz, pertenecen a clones con una expresión mayor en infección, lo que demuestra, que la genoteca PDS está enriquecida en genes que se inducen. Del resto de clones se obtuvieron 554 (38,5 % del total) no significativos, y 19 no fueron analizados por no cumplir los requisitos mínimos de intensidad de señal para ser analizados.

Teniendo en cuenta los datos de expresión obtenidos en la hibridación de la macromatriz se secuenciaron 76 clones más, incluyendo clones cuyo nivel de inducción durante la infección respecto al crecimiento en condiciones *in vitro* era igual o superior a 2 y que no habían sido ya obtenidos en la secuenciación aleatoria, así como algunos clones con niveles de expresión muy elevados o muy bajos. Las secuencias de estos clones se integraron con las obtenidas previamente mediante secuenciación aleatoria.

En la Tabla 14 se muestran los 24 unigenes cuyo valor de inducción en la muestra I3 fue mayor o igual a 2 comparado con la muestra H3. Tres de estos unigenes codifican proteínas hipotéticas (PDIP\_12700, PDIP\_61480 y PDIP\_23200) y dos (Cs2g28680.1 y fragmento entre Cs7g25660 y Cs7g25670) tienen homología con proteínas relacionadas con el fruto. Los agrupamientos restantes proceden putativamente de *P. digitatum*. El mayor nivel de inducción correspondió a una proteína extracelular con dominio de taumatina (PDIP\_76190).

Varios de los unigenes con mayor nivel de inducción durante la infección tienen homología con diferentes tipos de proteasas, como son una endopeptidasa aspártica (PDIP\_82060), una tripeptidil peptidasa S8 (PDIP\_12220), una aspergillopepsina (PDIP\_06020) y una serin peptidasa (PDIP\_67670). Otros unigenes presentan homología con enzimas degradadoras de pared celular, como la poligalacturonasa PG1 de *P. digitatum* (PDIP\_12220) y dos pectin liasas (PDIP\_67670 y PDIP\_08080). Algunos de los unigenes están relacionados con mecanismos de obtención de energía, entre los que se encuentran una piruvato quinasa (PDIP\_70570). Otro unigen con muchas ESTs y con alto valor de inducción es el que codifica una proteína C inducida por concanamicina (CipC), que está relacionada con el transporte de sustancias y resistencia a antibióticos. Otro unigen relacionado con la síntesis o metabolización de antibióticos fue el que codifica una aflatoxina b1-aldehído reductasa (PDIP\_27790). También encontramos unigenes relacionados con la hidrólisis de RNA, como una guanil-específica ribonucleasa (PDIP\_77270) y otro relacionado con la inhibición del inicio de la traducción (PDIP\_49840). Varios de los unigenes se engloban dentro del grupo de las oxidorreductasas, como son una sarcosina oxidasa (PDIP\_07830) y una glicerol dehidrogenasa (PDIP\_42980), que está involucrada en el metabolismo de glicerolípidos. También encontramos un unigen perteneciente al grupo de las fosfatasas, en concreto una fitasa (PDIP\_55120). También se encuentran agrupamientos relacionado con proteínas ribosomales (Proteína ribosomal 60S L13; PDIP\_15790 y Proteína ribosomal L34; PDIP\_71990).

**Tabla 14.** Genes presentes en la genoteca PDS con un nivel de inducción  $\geq 2$  en tejido de naranja a los 3 días de la inoculación con *P. digitatum* con respecto a micelio del hongo después de 3 días de crecimiento en medio de cultivo líquido.

Unigen	Proteína	No. acceso GenBank	No ESTs (significativas)	Anotación	Origen	Valor de inducción
SSH-38	PDIP_76190	EKV06798.1	2 (2)	proteína extracelular con dominio taumatina	<i>P. digitatum</i>	4.16 ± 0.59
PDS15G06	Cr. 7		1 (1)	Entre Cs7g25660 y Cs7g25670	<i>C. sinensis</i>	4.07
SSH-04	PDIP_06020	EKV21461.1	13 (11)	Aspergillopepsina	<i>P. digitatum</i>	3.88 ± 1.19
SSH-26	PDIP_67670	EKV08475.1	3 (1)	Serin peptidasa, familia S28	<i>P. digitatum</i>	3.88
SSH-06	PDIP_45260	EKV14128.1	10 (9)	Proteína inducida por concanamicina (CipC)	<i>P. digitatum</i>	3.81 ± 1.35
SSH-46	PDIP_12700	EKV20803.1	2 (1)	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	3.68
SSH-01	PDIP_82060	EKV05607.1	53 (44)	Endopeptidasa aspártica pep1	<i>P. digitatum</i>	3.51 ± 1.47
PDS01H10	PDIP_61480	EKV10010.1	1 (1)	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	3.68
SSH-34	PDIP_40860	EKV15256.1	2 (2)	Monooxigenasa con dominio de unión a FAD	<i>P. digitatum</i>	3.43 ± 0.4
SSH-50	PDIP_70570	EKV08094.1	2 (1)	Piruvato quinasa	<i>P. digitatum</i>	3.27
SSH-05	PDIP_12220	EKV20850.1	12 (10)	Tripeptidil peptidasa S8	<i>P. digitatum</i>	3.12 ± 1.13
SSH-02	PDIP_64460	EKV09364.1	16 (11)	Endo-poligalacturonasa	<i>P. digitatum</i>	2.88 ± 1.29
SSH-11	PDIP_77270	EKV06691.1	6 (4)	Ribonucleasa guanil-específica	<i>P. digitatum</i>	2.67 ± 1.03
SSH-17	Cs2g28680.1		3 (2)	Alfa-dioxigenasa inducible por patógeno	<i>C. sinensis</i>	2.6 ± 1.14
PDS09G03	PDIP_27790	EKV18231.1	1 (1)	Aflatoxina b1-aldehído reductasa	<i>P. digitatum</i>	2.53
SSH-24	PDIP_57790	EKV11104.1	3 (1)	Pectin liasa	<i>P. digitatum</i>	2.46
PDS08F04	PDIP_42980	EKV14602.1	1 (1)	Glicerol dehidrogenasa dependiente de NADP(+)	<i>P. digitatum</i>	2.42
SSH-32	PDIP_23200	EKV19512.1	2 (2)	Proteína hipotética	<i>P. digitatum</i>	2.23 ± 0.14
SSH-30	PDIP_07830	EKV21285.1	2 (2)	Sarcosin oxidasa	<i>P. digitatum</i>	2.22 ± 0.29
PDS08G09	PDIP_71990	EKV07821.1	1 (1)	Proteína ribosomal L34	<i>P. digitatum</i>	2.21
PDS02H01	PDIP_15790	EKV20495.1	1 (1)	Proteína ribosomal 60S L13	<i>P. digitatum</i>	2.20
SSH-15	PDIP_08080	EKV21276.1	3 (3)	Pectin liasa B	<i>P. digitatum</i>	2.07 ± 0.11
SSH-16	PDIP_49840	EKV13126.1	3 (3)	Inhibitor del inicio de la traducción	<i>P. digitatum</i>	2.04 ± 0.11
PDS09F01	PDIP_55120	EKV11691.1	1 (1)	Fitasa	<i>P. digitatum</i>	2.03

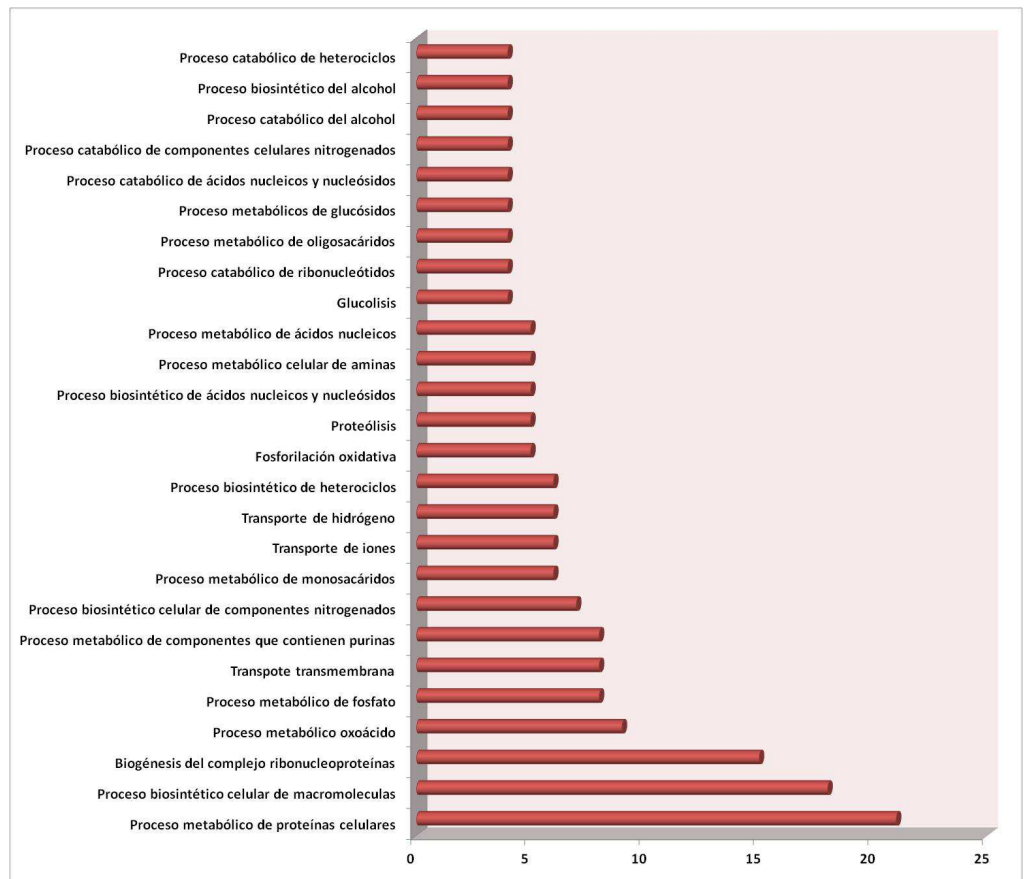
Cr; Cromosoma



### **3.3 Anotación funcional de las secuencias**

Después del análisis de la expresión de genes individuales, se procedió a la anotación funcional por ontologías génicas (GO, Gene Ontology) de los unigenes obtenidos de las 371 ESTs procedentes de la secuenciación aleatoria y de los clones seleccionados después de la hibridación de la macromatriz. Para ello empleamos el programa Blast2GO (Götz *et al*, 2008), que extrae los términos GO asociados con los genes homólogos identificados en el NCBI mediante el algoritmo BlastX. El análisis de ontologías génicas permite la categorización de genes en clases funcionales atendiendo a la función de sus homólogos. Las secuencias se asocian al proceso biológico en el que están implicados, a la función molecular que desempeñan y al compartimento celular en el que se localizan.

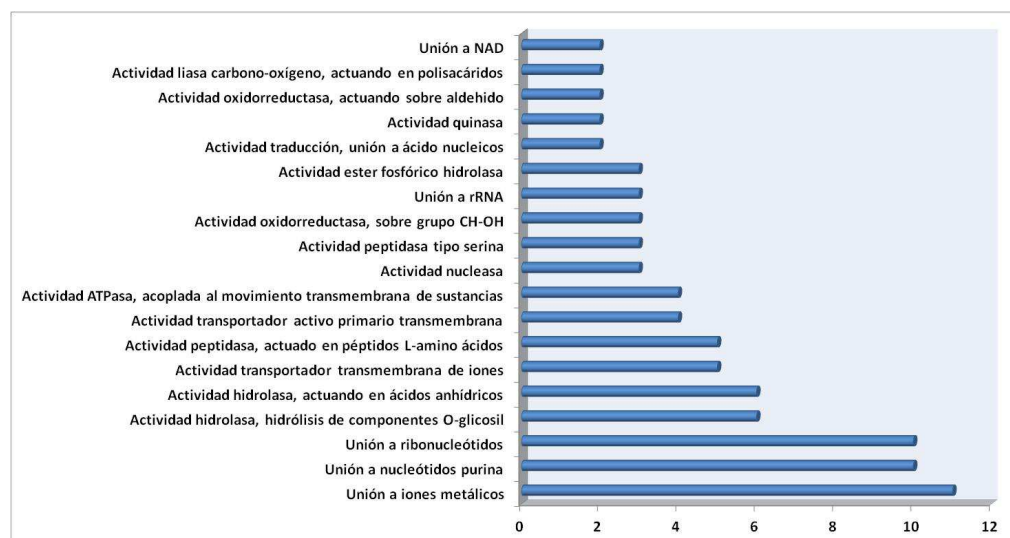
Antes de realizar este análisis se identificaron a qué genes de *C. sinensis* y de *P. digitatum* pertenían las ESTs de la genoteca. Después de descartar las secuencias quimeras (32), se identificaron 129 genes, de los que 106 tienen anotación GO. Ya que esta Tesis se centra en *P. digitatum*, sólo se incluyeron en el análisis los 94 genes del hongo que tiene anotación GO. En el análisis de procesos biológicos (Figura 40) están muy representadas las categorías relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y proteínas, incluyendo el metabolismo celular de proteínas y macromoléculas, biosíntesis de componentes nitrogenados, proceso metabólico, y el metabolismo de ácidos nucleídos, en el que figuran el proceso biosintético de nucleótidos y ácidos nucleicos. También están representadas las categorías de glucólisis y fosforilación oxidativa, que están relacionadas con la obtención de energía por la célula, así como procesos catabólicos y biosintéticos del alcohol. Estos procesos indican que el hongo está creciendo y desarrollándose, por eso también hay muchas categorías relacionadas con la biosíntesis y metabolismo de moléculas, como ácidos orgánicos, glucósidos, oligosacáridos, aminas, alcohol, fosfato, macromoléculas y compuestos nitrogenados. Varios procesos también se relacionan con el transporte, como el transporte transmembrana, transporte de iones y transporte de hidrógeno. También están representados varios procesos catabólicos de ribonucleótidos, ácidos nucleicos y componentes celulares nitrogenados. Con respecto a las categorías relacionadas con la patogénesis sólo hay una categoría representada, la de proteólisis.



**Figura 40.** Análisis de Ontologías Génicas (GO) en la categoría de “proceso biológico”, nivel 5, de los 170 unigenes obtenidos de la genoteca PDS. El análisis se llevó a cabo con el programa Blast2GO.

El estudio de la función molecular (Figura 41) indica que están muy representadas todas aquellas categorías relacionadas con la patogénesis del hongo, como son dos actividades hidrolasas, sobre componentes O-glicosil y ácidos anhídridos, actividad peptidasa y serin peptidasa. La categoría más representada con diferencia está relacionada con la unión a iones metálicos. También relacionada con los iones está la actividad transportador transmembrana de iones. Otras funciones relacionadas con la membrana son el transporte activo primario a través de membrana y la función ATPasa acoplada a movimiento transmembrana. Varias de las categorías se engloban en actividad oxidorreductasa sobre diferentes sustratos como son grupos CH-OH y aldehídos. Varias funciones están relacionadas con los ácidos nucleicos como son la unión tanto a nucleótidos purina como a ribonucleótidos y una actividad nucleasa que produce la hidrólisis de los enlaces ester de los ácidos nucleicos. En menor medida están representadas las actividades hidrolasas, quinasa y

liasa. Por último una de las categorías está relacionada con la traducción de proteínas como es la unión a RNA ribosómico.



**Figura 41.** Análisis de Ontologías Génicas (GO) en la categoría de “función molecular”, nivel 5, para los 170 unigenes obtenidos de la genoteca PDS. El análisis se llevó a cabo con el programa Blast2GO.

### 3.4 Análisis de la expresión génica mediante hibridación Northern

A partir del análisis de secuencias se seleccionaron varios clones en función de su abundancia, su expresión diferencial o por su posible implicación en el proceso de infección para analizar su patrón de expresión. Mediante análisis Northern se llevó a cabo el estudio temporal de la expresión de estos genes en las dos condiciones estudiadas (infección y crecimiento *in vitro*) y también la confirmación de los resultados obtenidos previamente mediante la hibridación de la macromatriz. Tanto en la secuenciación aleatoria como en el análisis de la macromatriz los genes más abundantes son los que codifican proteasas y enzimas degradadoras de pared celular. Ambas actividades han sido descritas como factores de virulencia en varios hongos fitopatógenos, por lo que se realizó el análisis Northern de todos los genes que codificaban proteasas obtenidos en la genoteca PDS: una endopeptidasa aspártica (PDIP\_82060), una tripeptidil peptidasa S8 (PDIP\_12220), una aspergillopepsina (PDIP\_06020), una serin peptidasa (PDIP\_67670) y una carboxipepsina (PDIP\_71590). También se seleccionaron los genes que codifican enzimas relacionadas con la pared celular, como son una endoglunasa (PDIP\_65210), dos poligalacturonasas (PDIP\_12220 y C34110E09), una pectin liasa (PDIP\_57790), una manosiltransferasa (PDIP\_59020) y una

glucanasa (PDIP\_08210). Otro grupo de genes que también se han relacionado con virulencia son proteínas que actúan en detoxificación o que están relacionadas con resistencia a antibióticos. En la genoteca se han obtenido cuatro genes relacionados con estas actividades: los clones que codifican un transportador MFS (PDIP\_09580), una P450 14  $\alpha$ -esterol demetilasa CYP51B (PDIP\_01820), la proteína CipC (PDIP\_45260) y un transportador de unión a ATP denominado PMR4 (PDIP\_53810). El último grupo de genes seleccionados están relacionados con el metabolismo redox, incluyendo genes que codifican una tioredoxina (PDIP\_60580), una superóxido dismutasa (PDIP\_66470) y una proteína rieske [2Fe-2S] (PDIP\_10140).

Una vez seleccionados los 19 clones para su análisis se prepararon filtros para realizar las hibridaciones Northern a partir de RNA de tejido de naranja infectada a los 1, 2, 3, 4 y 7 días tras la infección y RNA de *P. digitatum* a los 0, 1, 2, 3 y 4 días de crecimiento *in vitro*, en medio de cultivo PDB. Se incluyó además un control negativo de herida de RNA de naranja "Navelate" a los 3 días de practicar la herida. Los resultados de estas hibridaciones se muestran en la Figura 42. Para la normalización de las señales de hibridación de cada mRNA, se hibridaron todos los filtros con una sonda proveniente de un fragmento del gen 28S rRNA de *P. digitatum* (Figura 42). Para la cuantificación de las señales obtenidas en las hibridaciones Northern la intensidad de la señal se normalizó en primer lugar teniendo en cuenta la cantidad de RNA ribosómico de *P. digitatum* presente en cada muestra y tras esto se le asignó arbitrariamente un valor de 100 a la muestra de tejido infectado a los 3 días tras la infección, refiriendo el resto de valores a éste.

Todos los genes que codifican proteasas presentan un patrón de expresión diferencial, ya que se expresan más durante la infección que durante el crecimiento en medio de cultivo, aunque el patrón de expresión que presentan no es igual en todos ellos. El único gen que no se expresa *in vitro* es el que codifica la carboxipeptidasa, siendo el gen de la aspergiloepsina el único que se expresa durante todos los días en medio de cultivo, aunque su expresión es baja. Los otros tres genes sólo se expresan a día 1 *in vitro*, destacando la gran expresión del gen que codifica la endopeptidasa aspártica. Durante la infección se expresan los cinco genes, siendo los genes de la endopeptidasa aspártica y la tripeptidil peptidasa los que tienen mayor expresión desde día uno de infección. Los genes de la carboxipeptidasa y la aspergiloepsina son los únicos que mantienen una expresión alta hasta el último día. Sin embargo, tanto el gen de la serin peptidasa como el de la tripeptidil peptidasa disminuyen mucho su expresión a partir del día 3. De todos los genes la mayor expresión corresponde al que codifica la endopeptidasa aspártica.

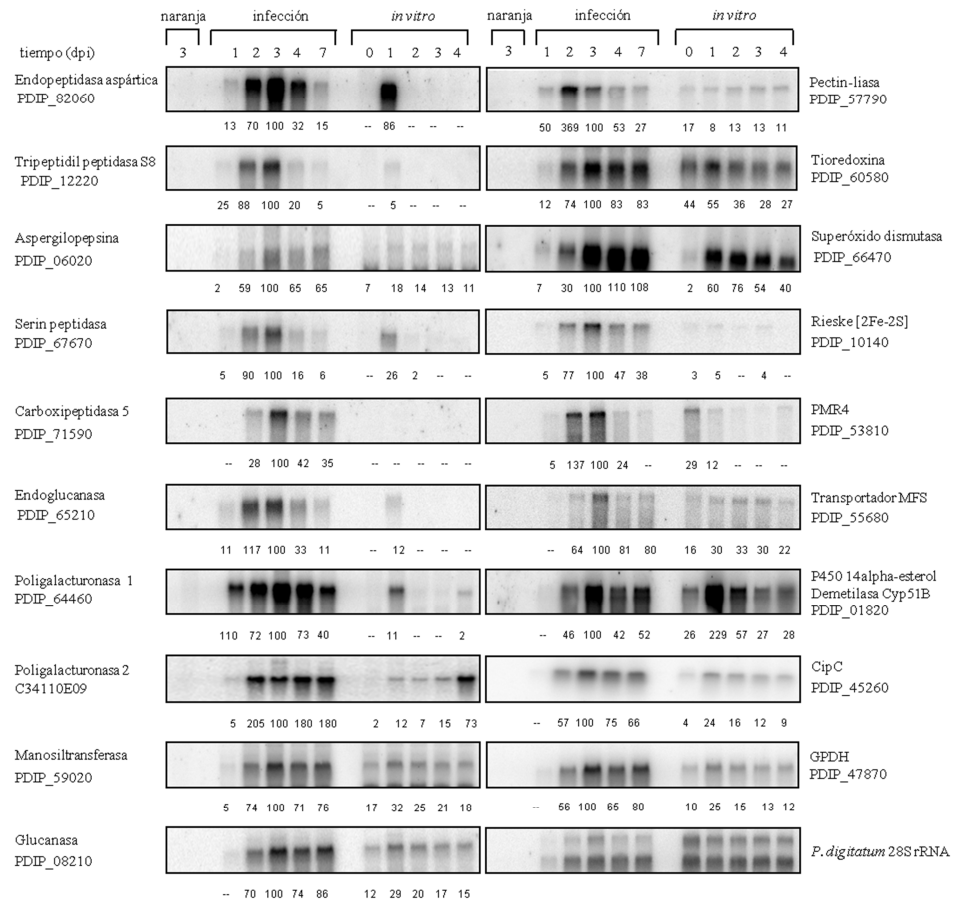
De los genes relacionados con la pared celular también se incluyó en el análisis un gen que codifica otra poligalacturonasa (C34110E09) proveniente de la genoteca PostharvP1 (Marques *et al.* 2009). Al igual que con los genes que codifican proteasas, en todos los genes relacionados con pared celular se observa un patrón de expresión claramente diferencial en infección respecto al crecimiento *in vitro*. El gen que codifica una endoglucanasa muestra una alta expresión en infección y no se expresa apenas *in vitro*, mientras que los dos genes que codifican las dos poligalacturonas tienen un pico de expresión durante el crecimiento *in vitro* a diferentes días, uno a día 1 y el otro al cuarto día de crecimiento. Además, destaca

la gran expresión del gen de la poligalacturonasa 1 a 1 dpi, cuando el resto de genes apenas se expresan. Los patrones menos diferenciales corresponden a los genes que codifican una manosiltransferasa y una glucanasa, que aunque tienen una expresión mayor en infección mantienen una expresión basal durante todos los días de crecimiento *in vitro*. Todos los genes, excepto el que codifica la endoglucanasa, mantienen una alta expresión durante todo el proceso de infección.

Respecto a los genes relacionados con el metabolismo redox destaca el patrón de expresión del gen que codifica una proteína rieske, ya que sólo se expresa durante el proceso de infección, con un máximo a 3 dpi. Los otros dos genes analizados presentan mayor expresión durante la infección, aunque también muestran expresión durante el crecimiento *in vitro*. También destaca la alta expresión del gen que codifica la tioredoxina, incluso desde día 0 de crecimiento *in vitro*, que corresponde con esporas.

También se ha incluido en los análisis Northern varios genes relacionados con resistencia a fungicidas. Todos ellos muestran una expresión diferencial en infección, excepto el gen que codifica una P450 14-alfa-sterol demetilasa, que es el único de todos los genes analizados que no muestra una expresión diferencial en infección y se expresa más *in vitro*, con un pico de expresión a día 1. Del resto de genes destaca *PMR4*, que es un gen que codifica un transportador ABC, que tiene su máximo de expresión a día 2 de infección. Los otros dos genes, que codifican un transportador MFS y una proteína inducida por concanamicina (CipC), presentan el máximo de expresión a día 3.

Por último se incluyó para su análisis un gen que codifica una gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa como control de un gen clásicamente considerado como un gen constitutivo de alto nivel de expresión. Sin embargo, como puede verse en la hibridación, también tiene una mayor expresión en infección con respecto al crecimiento *in vitro*.



**Figura 42.** Hibridaciones Northern de los clones seleccionados de la genoteca PDS enriquecida en genes de *P. digitatum* que se inducen durante el proceso de infección de frutos de naranja. Como control se utilizó RNA de fruto a los 3 días tras la realización de la herida. Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: endopeptidasa aspática (PDIP\_82060), tripeptidil peptidasa S8 (PDIP\_12220), aspergillopepsina (PDIP\_06020), serin peptidasa (PDIP\_67670), carboxipeptidasa (PDIP\_71590), endoglucanasa (PDIP\_65210), poligalacturonasa 1 (PDIP\_64460), poligalacturonasa 2 (C34110E09), manosiltransferasa (PDIP\_59020), glucanasa (PDIP\_08210), pectin-liasa (PDIP\_57790), tioredoxina (PDIP\_60580), superóxido dismutasa (PDIP\_66470), proteína rieske [2Fe-2S] (PDIP\_10140), PMR4 (PDIP\_53810), transportador MFS (PDIP\_55680), P450 14 alfa-esterol demetilasa Cyp51B (PDIP\_01820), CipC (PDIP\_45260) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (PDIP\_47870). Para cada uno de los genes analizados la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto a la de la sonda 28S rRNA de *P. digitatum*. Al pie de cada panel se muestra la cuantificación relativa de la correspondiente señal referida al valor de la muestra de infección a día 3. El análisis se realizó a los 1, 2, 3, 4 y 7 días posteriores a la infección de los frutos de naranja con *P. digitatum*, así como durante el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* a los 0, 1, 2, 3 y 4 días de incubación en medio PDB.

#### 4. Análisis de genes presuntamente implicados en patogenicidad/virulencia

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de los genes de la genoteca PDS seleccionamos varios genes candidatos para profundizar en el estudio de su posible implicación en el proceso de infección de frutos cítricos mediante la obtención de mutantes nulos de *P. digitatum* que carezcan del gen objeto de estudio.

Aunque es evidente que los genes que codifican diferentes proteasas son buenos candidatos, nos encontramos con un gran número de proteasas, lo que conlleva la posibilidad de que exista una redundancia funcional entre ellas. De ser éste el caso, el efecto de la eliminación de alguno de estos genes puede quedar enmascarado por el resto, por lo que sería necesario obtener un mutante carente de la mayoría de estos genes, objetivo que técnicamente no es factible debido a la falta actual de herramientas moleculares para *P. digitatum* que lo permitan. Por esta razón, se desestimó el estudio de estos genes mediante la aproximación de obtener mutantes nulos.

Atendiendo a su expresión diferencial en el proceso de infección se seleccionaron los genes que codifican la poligalacturonasa 1 (PDIP\_12220), poligalacturonasa 2 (C34110E09), pectin liasa (PDIP\_57790) y la proteína rieske [2Fe-2S] (PDIP\_10140). No se seleccionó ninguno de los genes relacionados con fungicidas ya que en los proyectos en los que se enmarca esta Tesis (AGL2005-04921 y AGL2008-04828) hay otro grupo implicado, el grupo de la Dra. Paloma Sánchez del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), que trabaja con este grupo de genes y ha realizado este tipo de aproximación con varios de los genes relacionados con fungicidas identificados en el presente trabajo.

##### 4.1 Poligalacturonasa 1 (*pg1*)

La secuencia del gen *pg1* (Figura 43) tiene 1225 pb y presenta dos intrones (posición 226-282 y 703-766 en la figura 43), de forma que codifica una proteína, denominada PG1, de 367 aminoácidos, que tiene una masa molecular teórica de 37,75 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 8,04. La secuencia del gen *pg1* es 100 % idéntica en los 1225 bp a la descrita por Arimoto (GenBank, No. Acceso AB015286) . Sin embargo, en los 588 bp de promotor descrito en la secuencia AB015286 hay 3 diferencias, mientras que en los 539 bp de terminador ambas secuencias son idénticas. La comparación con las secuencias disponibles de los genomas secuenciados de las dos cepas de *P. digitatum* Pd1 y PHI26 mostró un 99% de identidad para las secuencias correspondiente a las poligalacturonasas PDIP\_64460 para Pd1 y PDIG\_30080 para PHI26. También se han secuenciado 1676 pb de la zona del promotor y 2047 pb de la zona del terminador. En la región promotora no se ha identificado la presencia de ningún gen, pero en la del terminador se ha identificado la presencia de un gen entre las posiciones 1694 y 2097 que contiene un intrón (posición 1944-2097). El posicionamiento de intrones se ha llevado a cabo comparando secuencias homólogas y teniendo en cuenta que en hongos filamentosos los intrones suelen comenzar por "GT" y finalizar en "AG" (Kupfer, *et al.* 2004). Este gen codifica una epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD, que pertenece a una familia de proteínas que utilizan el NAD como cofactor y azúcares como substrato en un gran número de reacciones químicas. Además, en el final del fragmento secuenciado, y en la cadena complementaria, se encontraría un gen que codifica una proteína muy similar a la

fenilacetil-CoA ligasa de *P. chrysogenum* y cuyo codón de parada está ubicado en las posiciones 2840-2838 y que corresponde con el gen PDIP\_64470 de Pd1. Esta proteína está presuntamente involucrada en la activación del ácido fenilacético durante la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.

```

-1676   CCGAGTTCGGATGGTTTCATGTCAAATACGTAAACTCCCGTCATAATGCACGTGGATATAACGTATATCCCGTTTC
-1600 AACAAACTAATCCCACTGCTTCATTTTAGGTCACCACAGTAACACCGAAATTTTCTCGTCACACAACTTCGTTTGATT
-1520 CTTCATTCCATCCCATGCAAAATTCGTTACATCGAGGGTTTGTGATGTCATTTCAAGCTGGTTTCAACAAATTAATGCTT
-1440 GGCACCAAAACCACGTGATTCACCTGATATAGCCGATTAAGATGCCCACTGGTCGATCCAACTTCCAAAAGTGGCTC
-1360 TACGAGAGTAGTTACTTCAATGCGATTATTAATAGACACGAAAGAAAGTTTCATGGAGCCGAAAGTGGGGTACAGAA
-1280 GCAGAGCGATGTTCTGTGGCAGGGACTTTTTTTGGAGCATAAATTTATGTGGCACCAGAAACATAACATGACATGATT
-1200 ATTTTCCATGGCAACTGGTTTTCATTAACAGAAATACCTGGCTTAGATGAAACTTTTCACTTAATTCGTTCCGAACGGGGGT
-1120 TATAGTAGGAGACTTCCCATCTTAGATCTGCGGTACCCATAGCAAGCCACACAGATATGGGCCCTACGACACATTT
-1040 CCATCGGAGGTAAGGAGTAATTTGACCAACACTTCGATATCTCAATCGCGCTTAGACGAAAGACTCCCTCTGCCACTGAA
-960 CAAGCGCAATTTGCTGGATTGAGGTGCTGCGTGGTTCTTTGAGTAACCTCAGGGGATGTTGGTGTGTCGCCAGGTACC
-880 GGGAGCAGGATCTCGGGATACCTTCGTAAGGTATCGTAGCATCTTAACCTGTTGATGGACACACAAATGGCCAGTTAC
-800 ATCCAATCCCTGTTTTGTACTTCGTACGGAGCAGTGCACTTTGTCTCAAGTCTTTTATCTAAATTTAGGGCACCAA
-720 TFAAATACAGACTCACACGCAACATGTGTTAAATAAAAGGGTGTATGTTTTCAGCGCCACCAATTCCTCCGGAAAT
-640 TTTTCAACACTCCATCGTTAACCCAGCCCTACTCCGTCCTCATCGAAATTTCTCCATTTAAGTGTCTGGCGTGAACACA
-560 AGCTTGTTCGGAGGGATGGATCTCGACATATTAATCCTGGTCCCAATTTGACAAACAAAGCAGGATGCTCCGGCCCTTT
-480 ATCCGGAGAGATTCGGCGGTAACTGTTCAGCAATCGTTATTTCCACAGAGCTCTAGACTGGATGATCTAATGTTT
-400 CGGAGACTTACCAAGTTGGGTTTCCCTAGTTAACCTAATAGATTAATTTAATGATCCAAATGGAGCACCTAACAAAT
-320 ATCCATTCACCCGGAGGAGTAGATCTCAACACTTACTTTTCACTAAGTGGTCAACTGAGAACAGGGGTCAACATCATG
-240 ACAGATGGTGTAGTCTCGTTTCATGAGGATGTTAGGCGAGGGGACTCAGGAAGATAAATCTGCAGACTAGACATTTAAA
-160 TACAGAGGCCAAGCTCGATGGAATAGCTTTTTCCAAACAGTCAATCTTTTCACTCATTCACATTCATTCCTCATTTTC
-80 TTTACACTCAAGTCGGCTAGTCCCAACATCAACACTCTTTTGTTTTTACGTGTCTGTTGATCGGACATCTACTTCAA
1   ATGGCGACACTCTTTCTGTTACCATGCTGGCCCTCGCGCCCGCCCGCTGTCGGCTGCCCAGCTGCTCCTGTATCTGATCT
81   CGTTGAGCGCGGCTCGAGCTGCACCTTCAACCCGCTGAGCGCCGCAAGGCTGCAAGGGATCTGCTCCACCATTTGTCG
161  TGGACAACAATCAAGGTTCCCTGCCGTTGAGACCTCGACCTTACCAAGCTGAAAGTCCGGTACTCAAGTtagttgctgtt
241  atgcaagcgtcaacccccacatatctaaccgctactgtgtagGTCGCTTCAAGGGCGAAACCTCTTTCCGGATCAAGGA
321  GTGGACTGGCCCTCGTCAGCTTCTCCGGAAGCAACATTCACGCTCTCCGCGCTGCCCGGCTGATCATCAAGGGTGGGG
401  GTCCAGCTGGTGGGACGGCAAGGAACCAACGGCGGAAAGAAAGCCCAAGTTCCTTACGCCCCACTTGGACGCA
481  TCGACCATCAGCGGTCTGAACGTCAAGAACACCCCGTTCCAGGTTTCAGTATCTCGCTGACCGCTGACCTCGACCA
561  CATCCACTCGAACAGCGAGGTTGATGCAAGGGTGGCCACAAACCCGATGCTTCGATGTTGGCTCCAGTACCTTCA
641  TCAACATCTCCAAAGCAACATCAAGAACAGGATGACTGCTGGCTATCAACTGCGTCTGgtaagtccaccaaaaaca
721  cctctaccagcaaatcatcaatcaactaacccggttgcccaactagAACATCAAGTTCGTTGGCGGCACCTGCTCCGGG
801  GCCACGGTATCTCCATCGGTTCCGTTGGCTTGGCGGACAACAATCGTGAAGGATGTCACCATCTCTGACTCTACCCT
881  ATCAACTCCGACAAACGGTGTCCCGCTCAAGACCACTTACAGGCCACCGGTGCTGTCTCCGGCTCACTTTTCCAAACAT
961  CAAGCTGTCCAAACATCGCCAGTACGGTATCGTTCATCGAGCAGGATACGAGAACCGCAGCCCTACCGGCAAGCCACCA
1041  ACGGTGCCCACTCTGAGCTCAACATTTGAGAACGTTACCCTGACCTTCAAGAGTCCGCTGAAATATGCTAGTGTCT
1121  TGGGTAAACGGTAGCTGCAAGAACTGGAATGGGCTGGAACCTCTCTCTCTGTTGGTAAAGAAAGTGGCAAGTGGGTAA
1201  CGTGCCTCCGGTGTCTTTGCTAGATTGCGCAGCATCAATGGTGAACACCAACAGCATGACATGACACAGCAGAGAGA
1281  CTGGGTTATCTTGAAGACAAAATTTGACTGGATGATCAAGGGTATCACAGGAGTATCACAGGATGATGCTAGTGTCTCC
1361  ATCTTTGTACTTTTACATCTCTATATAGAGCCATTTTACGATGGAATTTAAATTTGATGTTTTTTAACCTTCTGCAATG
1441  GCTAAAAATGAGGAGACTATAACACTGTGAAGCAACACAGAGATTTAGTGAACACTACTCAAGTAGCTATGATTCGATTC
1521  TACAGCAGTCTCCACCAGTCTCCACCTTACAACATTTCTTCCCAATTACAATAACAGCCCAAGCTCACCCCGTTGGCGCAT
1601  GACGCAACGAGCTTTCTCCCAATCAACACTCAAAATATCACTCTCTCCATCTTCTCACGACACAAAGTCTCATTCAA
1681  ATCATATCCAAATATGCAATGCTCTTTTACTGGGCGGTATGGCAAAGTGGCCCTCCACTTACTCCGCTCTCTTCAACC
1761  GGGCCTGGAGCGTAACCAAGCTTATCGCAACCCCGGCACGAAAGCGAAATTTCTAGCTCTAGGTAAGGCTCAAGGGC
1841  ACACTCAAAGTTTACTTTTCAAGTTTATAGAGCAGTGAAGAGTCCCTCGGATGCTCAAAAATATCATGACACAGTTACGGC
1921  GGACTATGTCGCTGGTGGCTGgtatggcaacctaaccacaactattcttggatcatcccaagcgagcatgcaca
2001  cattatccacacaaaagcaagaaaaagcataataaacctcatgcaccttgaaccccccaatgcaagtttcaaatcacaca
2081  aactaacacacaaccagTGCCGGGGCAAGGGCGGCCCGCCGACAACTCGCAATCGACCAAGAAAGCCGCGAAGCACT
2161  TCATAACAGCATCTTCGCTTCAACAGGTGTAAGCAAATTTCTCATGTTGTCATACCTCGGTAGTGCAGCAGCAGCCG
2241  AGCTGGATGCCCGACGACGAATGGCGGGGATTTTCAGGACGAAACCGGAGTACTGCCACATACGCCACAGCCAGCA
2321  AGAAGCCGATGAGTACATGACAGCACCTGGCTGCGCAGCGGAAGCAAGATGCTGGCCAGCGCGCCATTTTCAGGCTATTA
2401  ATCTCGCGCTGGACTTTTGTACTGACAAGCTTGCAGCGCGAAGGTCGAGCTGGGGATTACACTTAAGGGCCGGGGAAGC
2481  GTTACTCGGGAAGATGTGGCAATCGTGGCGGATCTGTTACTTGGCAGGGCTGATACGGAGGGGTGGATTGATCTTTGCAA
2561  TGGGAGAGGGGGTTGAGGAGGCTGTTGAGAGGGTTGCGAGGGAAACATTTGATCTGTTGTTGGGAGGATGTTGAGG
2641  GAAATGGTCAAGAGGTTCTTTCTTAGGTTATTTGAAACCGGGTTGAATCTCTAGATTTTTGACAGGGAAGGGCTTTGG
2721  GTTGGATATGATATATGATACCCGTCAGGCTTTAGAAACATTTGTTGAGTTTGAATAAGAAATGAACATGAACAAATCT
2801  AGATTTGGATTGCGTGCCTAATCTTAGAGAAATCATTTTACAGCTTGGCTTTGGGTGCTTGGCCACCGCCCTTGAGCCCT
2881  TGCTTCAGAAATCCGACGACGAGGATCTTCCACTGGGGTTCTTGGGATCTGCTTCCAGAACTGCACACCACCACGACGCG
2961  CTGTGGCTGGCGACTTGTCTATCCAGCCATTTGATAATGTTGCTGCTCGTCTTCCACTTTTTCAGAAAGACTTGC
3041  TCTTCGCGCTGCGAAGCAGCAAGCCATAGGAACCTCGGAACCAATGTCCTTCACTCTCAATACCAATGACAGCAACGTC
3121  ATCAACAGCATCTGTTGCAACAGATATCTTCTAGCTCAGCAGGAGGACCTGAAGGCCCTTATCTTTTAAAGCTCTCT
3201  TGACACGGTCCGTTAAAGTAGAAGTTGCCCTTGGCGTCTTGATCCCAACATCACCAAGTTTGGAAACCCCGCT

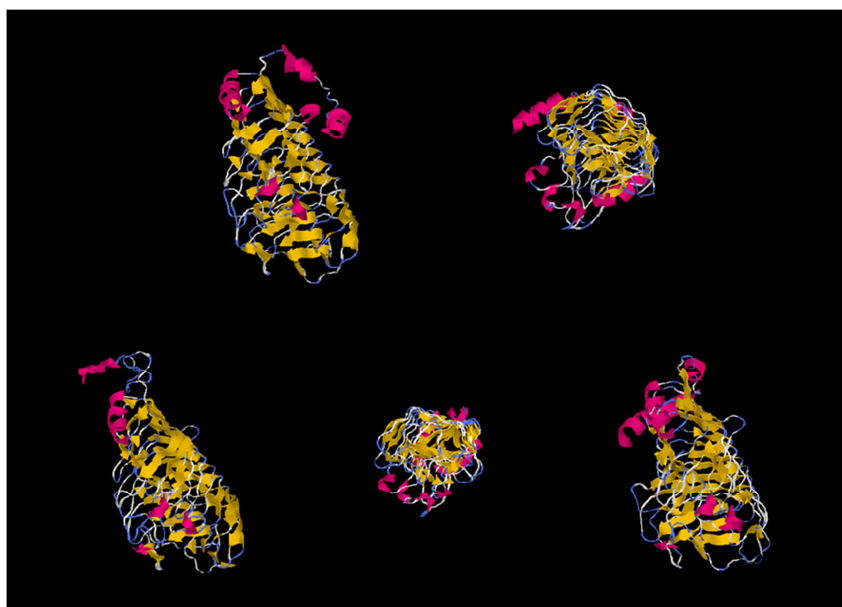
```

**Figura 43.** Secuencia completa del gen *pg1* de *P. digitatum*. En rojo se muestran los exones del gen. Dentro de las regiones promotora y terminadora que están marcadas en negro se han localizado parte de la secuencia de otros genes que están marcadas en verde y en azul.



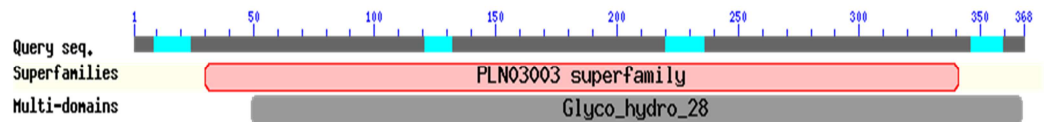
El análisis informático de la estructura primaria de la proteína con la aplicación SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) revela que PG1 presenta dos dominios de baja complejidad (aa121-132 y aa346-359) y 5 dominios PbH1 (Parallel beta-helix repeats), dominios de repeticiones paralelas de cadenas beta formando hélices. Estas estructuras son típicas de las pectato liasas y rhamnogalacturonasa A. Normalmente los sustratos de este tipo de proteínas suelen ser polisacáridos a los cuales hidrolizan. El mismo programa muestra la existencia de un posible péptido señal que comprende los 18 primeros aminoácidos y cuya secuencia sería (MRTSFVTMLALGAAVSA).

Mediante el servicio online I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2008) se ha predicho la estructura secundaria de la proteína y se ha obtenido un modelo en 3D de la misma a partir de la secuencia de aminoácidos. Dentro de la estructura predicha, el 50 % de los aminoácidos forman 30 hojas beta (representadas en color amarillo en la Figura 44) y un 4 % de los mismos forman 4 hélices (color rosa). La mayor similitud en el banco de datos de proteínas ya resueltas (PDB-Protein Data Bank) corresponde a una endopoligalacturonasa II de *A. niger*. El programa predice que los principales ligandos son N-acetil-D-glucosamina y el ion zinc. La predicción de la función nos muestra que corresponde a una poligalacturonasa cuya función es la hidrólisis aleatoria de los enlaces alfa (1->4)-D-galactosidurónico en pectato u otros galacturonanos y que se trata de una proteína extracelular. Por lo tanto, PG1 sería una endopoligalacturonasa extracelular.



**Figura 44.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PG1 utilizando el programa de predicción I-TASSER. En amarillo se representan las hojas beta y en rosa las hélices alfa.

Una caracterización más profunda *in silico* de la estructura de la proteína PG1 de *P. digitatum* desde la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) permitió la detección del un dominio de la familia 28 de glicosil hidrolasas (aa 49-367) (Figura 45). Esta familia incluye tanto poligalacturonasas como rhamnogalacturonasas, enzimas importantes en el metabolismo de la pared celular. Además, la proteína PG1 presenta similitud con la superfamilia PNL03003, que engloba a poligalacturonasas.



**Figura 45.** Localización *in silico* de dominios en la proteína PG1 de *P. digitatum*. El análisis se llevó a cabo en el NCBI con el algoritmo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **4.2 Poligalacturonasa 2 (*pg2*)**

La secuencia del gen *pg2* (Figura 46) tiene 1308 pb con tres intrones (posiciones 256-311, 735-789 y 920-979). La proteína deducida, denominada PG2, contiene 378 aminoácidos, con una masa molecular de 38,52 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,15. La proteína más parecida presente en la base de datos del Genbank es la poligalacturonasa de *Penicillium griseoroseum* (No. acceso AAF06810), con la que comparte una identidad del 75 % y una similitud del 86 % (Figura 47). La secuencia obtenida tiene un 100 % de identidad con las poligalacturonasas PDIP\_19910 de *P. digitatum* Pd1 y PGIP\_50670 de *P. digitatum* PHI26. También se ha secuenciado 1464 pb de la zona del promotor y 2125 pb de la zona del terminador. En el promotor no se ha identificado ningún gen, mientras que en el terminador, en la cadena complementaria, se ha identificado parte de un gen PDIP\_19900, cuyo codón de parada está en la posición 2593-2591, que codifica una proteína con similitud a proteínas que contienen el dominio PH (“Pleckstrin homology domain”), que es un dominio de aproximadamente 120 aminoácidos que está presente en un amplio rango de proteínas de señalización. En la región terminadora hay una diferencia de 10 nucleótidos entre la secuencia obtenida y la depositada en la base de datos del NCBI. Estas diferencias se encuentran en una región rica en adenosinas y otra rica en citosinas por lo que puede haber llevado a un error en la secuenciación 454 ya que la revisión de los cromatogramas obtenidos con el paseo genético no deja lugar a la confusión.

```

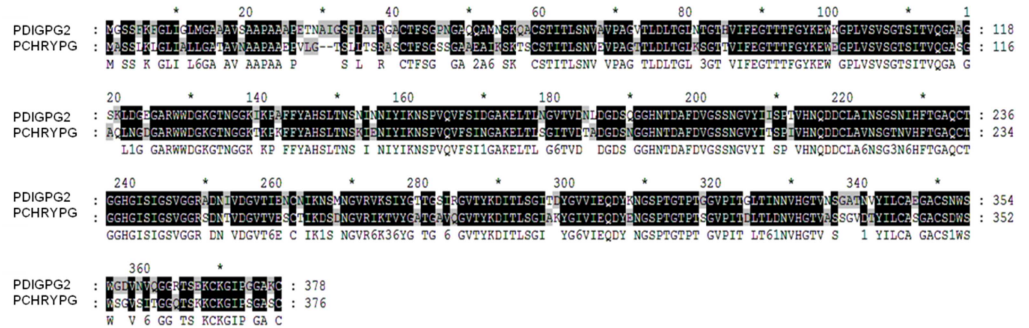
-1464                                     CTCCTACTCTGCATACAACCGAACA
-1440 CTCCTACTCTGCATACAACCGAATCTTCAGATTTTATTTCGTACAGTTTGCACAGCCAGAAAAGGAGCACCATTTGCTATCA
-1360 TCCAGGGCGAGTTGGGAAGGGTTGCTCCGGTGTGAGCCAGTCTGTTTATAGGTAGTGAAACGACCGTTAGGTGGGGCTGT
-1280 CGGATTACCGTCCACCAGCGTGCCTGTGCTGTGGGGTGTGCTTTATGAAGCTGTCTCCGTGGAAATTTAGGAGGATAGG
-1200 GCGTGGAGGGTAGGACTGGGATTTGTGGCTGGGCTTTGGTGTAGTGGATTAGATGGAGCGGTGTAGAGGTTGATCAGGATTG
-1120 TGGATGGCGAGTCTGATAAAATTTTGGTTGGGAAAGAGACCCCATGGCATTGATCTCAACATCGCCATCAGAGAACGAAAGA
-1040 TCGACAGAGTGGGGTGGAAATGTTCTTCTTCCTGAGACAAAGACCGTCTCAGCAAATTTGGACCAGACTATCCGGTAGCCT
-960 TTATTCCTTCGTTTGGAAATTTTGGGTACAGGAGTTTGTGGAGTCCAACTACAGGAGAGAAATGATACCCTCCGAAATCC
-880 TCAGGTTGTCAATGATATGCTTGTCCCTATCCAGAAGAGATCTCCCGCATGAAGCTTCCGTGCATTTCCCTGACAGGGCC
-800 TCATCCTAATGTGAGATGGACAACCCCTGGTCATATCAAAAGGACATGTCAATAATTTCTATGTAGTGTACTACACTTTCC
-720 TGGACAAAGTGTAGTCTGTCCAATATACTTCGTACAATAACTCCGCCCTACCCGGAAGATAGGGGGTTTGGCAGAGAGCT
-640 ACCAGGAAAAATAAGTGGAGAAATGACCCGTTTGTAGGAATAGCTTTATTCCTGATAGTGGGACCTGAAAGCTTAAACAGATTG
-560 CTTGTCTCTTTTCCCTAGTCTCCGTAATTTGCCCTACACTCTGATTTGTATGACTGACAGCTACTCAACTCAACTACTCA
-480 ACTCCTCTGTACTCCCTATCCGATGTCTACGCTCAAATGGCTCTCTGTAGGAGAGAGAGTTTACGAGCTTCAGACCAAGC
-400 CGTCGGCTCTTGCACCCGATTTTCAGCAGCTTGCAAAATGAAACCCACCTGGGAACCTTGGATTGAAACAGCCATCTGA
-320 ATCCACAAAATAAGCTTGCATGATTTCTATCGACCTCCCTTTGGCCCCACACACATTTCTATCTTTCTTGTAGCTCCCATG
-240 GGGTTGAAACGGAACGGGGCTCCAGTTCACAGCACAATGGACGAAATTCAGGAGTGGCTCAACGGGCTCGGCTAAT
-160 CTCACAGGAAAAATTCGGGATATTTCCCCCTAATACGGTTCAGCTCTAGTTCAGTTCGTTTCAGGTCACCCGCTCGA
-80 AGTATATAAGCCCATCTGTCTGCTCCTTTGCTAGAAGAATCACAAAACCATCACACTCATTTCCCTTTTACTACTCT
1   ATGGGTTCCAGCTTCAAATTCGGCTCATCGGCTCATGGGTGCTGTCTGTCTCAGCGCTGCCCTTCCGCGCGCCCTGA
81  GACCAAATGCTATTTGGTTCTTTCCCTCGCCCTCTGTGGTGTCTGTACTTCTCCGCGCCCAACCGTGCAGCAGCCATGA
161 ACAGCAAGCAAGCTTGTCTCGACCTTACCTTGAGCAACGTCGCTGTCCCGCGGAGTTACTCTGGACCTGGATTG
241 AACACCGGCACCCACgtaagatcgtaaatctccgaccttgatctttcggtgataactaaccaagctcaatagGTCATCTTC
321 GAAGGAACCCACTTTCCGATACAAGGAATGGAAGGGTCCCTGTGCTCCGTTTCCGGAACCTCCATCACCCTCCAGGG
401 TGCCGCGGGCTCCAAGCTCATGAGAGGGTGCCTGCTGGGACGGCAAGGAACCAACGGCGGCAAGATCAAGCCTG
481 CGTTCTTCTACGCTCAACAGCTGACCCAACTCAACAACATCTACATCAAGAACTCCCTGTGACAGGCTTTCAGT
561 ATCGATGGCGCTAAGGAGCTTACTCTCAACGGGAGTTACCTTCGACAACTTCGATGTTGACAGCCAGGGTGGCCACAAC
641 TGACGCATTCGACGCTGGCTCCAGCAACGGTGTCTACATCATCAGCCCTACCGTCCACAACAGGATGACTGCTTTGCTA
721 TCAACTCCGCTCGgtatgtattttccaagagaggtctctgtgggaccttactgacggatctctctagAACATCCACTT
801 TACCGCGCTCAGTGCCTGGCGGTCAGGTATCTCCATCGGTTCCGTCGGTGGACGCGCTGACAACTTTGTCGACGGTG
881 TCACCACTCGGAACCTGCAACTCAAGAACTCCATGAACGgtacgcatgccaccgggtctcccttcccaaatgccagtttc
961 taaccttccctctctacagGTGTCGCTCAAGAGTATCTACGGTACCACCGGTTCCATCCGGGGCTCACCCTACAGGA
1041 TATCACCCCTCTCCGGAATCACCAGCTACGGGTGTGTCTATTTGAGCAGGACTACAAGAACGGCAGCCCTACCGGAACCCCA
1121 CCGCGCGGTCTCCCATCTCTGCTGACCACTCAACAACGTCACCGGAACCTGTCACAGCGGCTGCTACCAACGCTTACATT
1201 CTGTGTGCCGAGGGTGTCTGCTCAACTGCTCCCTGGGTGATGTCAACGTCACGGGTGGCCACTAGCGAGAAAGTCAA
1281 GGGTATCCCGCGGGTCTAAGTGTCTAAATAGCACACTGACAGGTTGAGTCGAGTTGTACAGCTTTTGACTCCTTGTCTGG
1361 CCGGGCTTGTGTGGCTTTAATTTTGTATCTACTTATTGCAACCGTCTGTATATAATTTTGGCTCCAGGGGAGGTTTATT
1441 GTTTAGTGTCTAGTTCAAATTAACAAATTTGTCAATTTGACCAATATCTTATCATCGATCTTGTATAACATGCAGAGACT
1521 TATTCCTGACGATCGCCGGTGCATAGGTTTTCGAAAATTCGTATTTAGCGCAGGAGAGGGCTTTCAGAACTCATCT
1601 GCATTTTGGAAATGGTGTCTGTGATCGGCGCTTGGGATCTCTCTTTTGGGCTTGTGCGAGCAGGACCGGCTCATGGCTGTGGA
1681 CAGGGCTGGGATTTCTGACAGCTTATCGCGCGAGCCCTGCTTCCGCGAGCCGCGGAGAGCTTGAACAAAGTTCTTCCGTGAC
1761 TTCGTATGTGATGCACCAATTCAAAGCGCGGACGCGACCACTTGTTTAGTTTACGGAGGGATTCGTGAAGAAATCGAGATT
1841 GTCGTGAGTAGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCGCTCCCGGCTTCCGATTTGTACGAGAAACAGCGAAATTTTCATTCGT
1921 TTAGTACCGAAGTACCCGATTTCTGGAGTCCGGCGAGAATTAGGTTGTGAGCTTGGTTTCAAGGTATTAAATTTGCCCTTT
2001 GAGCTTTGCGGTGCAACTACTCTGGCTATGATATACACTGACCAAGACTGATTCGGAACAAGAAATGTAGTGAAGAAAG
2081 GCGAAGATGAATCGCTGGTTTGTATATCCATGGTCAATCTATACCGTGTACATACAGGCCGATCTTTCCACAAGTCTGG
2161 TCTACATGTTGAAACAACATGCCAAATAAAAAAGAAAGAGATAAAAGGCAAGGACCCGATATAAAAGACAGGGAAGCG
2241 ACTTGCAAAAAATAAAAAAATAAAAAAAGGACGATCCACCACGCCCCATCTGGAACCTCCGGTTGGATGCGTGTATGCA
2321 AAGAAGAAATGAAGCAAATGGGAGACAAAGAAATGATAATGATGATGGTTGAGAGTGCAGGAGAAAGGAAATGCTTGCAGA
2401 GGGACGGGTGGAAAGCAGGTGCAACGGTTGATAGGGATAGGAGACTAGTGTGATTTCAAATATGAACAAAGAAATGACACTG
2481 CCGAAAAATGGGACGGGAAATGAGGAGTTGAAAGACTGGAAGAAAAAGGGAAAGGTCGAGAGAAAACGATGGATGGGAGACA
2561 GAGTCAAACCCGAGGGTAGAAACCGGCTAGTTAGCATGGGTGTAGTACCTCGATTCTTGACCGTAGGCTGTGTGTGCGG
2641 GATAGCTAGGCGGTGTTTGGCGGAGCTTGCGCCAGTTGCCCTTACCATGATGATCTACGGGGTCTTGCGGGGTGCACCGCC
2721 TGGTTGAGGGCATCCCAAGTGTGACTGGCAGTGGCATGTTGTACATGGACTCATGGCGACCATGTTGAGGTTGGATACAC
2801 AAAGCCAGCTTGTCTGGGATGCAATTTGTGTAGGAGCGAAATGGCGGCAAGAAATGTCGGCGCTACTGTTGCTGCATCATGT
2881 GTTGTGACGGTGCAGCAATGGCTGTGTGGACCGCTGGTTGACATGCCCCCTCCTCATTTTACGCTTTTTCAGCTCCCTTA
2961 GTATCAAATATGTGAGACAAGGCCCATAGGGTTTACTGGCGCTGCGGTTTCTGGTTGTCAATTTGACATAITGAAAGAGGA
3041 AGAACCACTATGCGGGCAACGCTCTCTGTTACAGAGCGGAAAGATTGGCCGAGCCCTCGTTGTAGGTAAGCATTTCCCT
3121 GGGCACCACGAGACAAAGGTCGATATGTGGCATCCCGCTGAGGATTCGTGGGGCATCTAGGACGGGCATGCTGGGTCAG
3201 TCGCCAGATACCGGGCGATGCATGACATAGGGTTGAAAGGGCTGCGGTTGTGGAAATGCATCGGAGGACTGGGGGCGC
3281 CCGTTGCTGCACGAACTGCTCCGGAGTAAGACCTCCACCTGGGGTGCAGGGCCGCGGGAAGCCATTCACGGCTGCCACA
3361 GCATGCTCCGTCGATATTTCTCCCGCTGGAAGGCCGGCCATTAGCCTGATCGATTGTTTGTAGTAGGCACAGA

```

Figura 46. Secuencia completa del gen *pg2* de *P. digitatum*. En rojo se muestran los exones del gen. Dentro de las regiones promotora y terminadora que están marcadas en negro se han localizado parte de la secuencia de otros genes que están marcadas en verde y en azul.

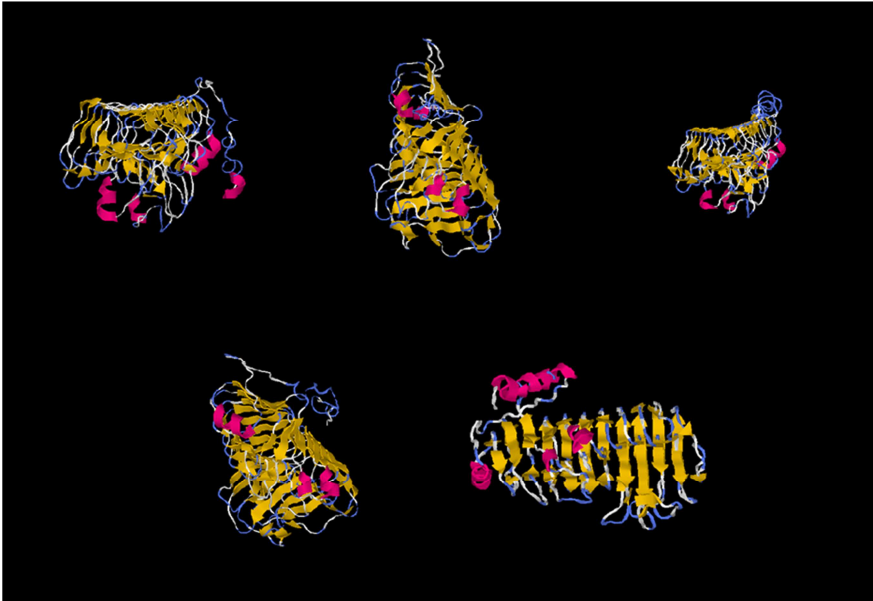
Según la aplicación SMART, PG2 presenta tres dominios de baja complejidad (aa 15-26, aa 151-162 y aa 310-326) y 4 dominios PbH1 (Parallel beta-helix repeats) (aa 172-210, aa 225-

245, aa 254-275, aa 283-305), como los encontrados en la proteína PG1. El mismo programa muestra la existencia de un posible péptido señal que comprende los 20 primeros aminoácidos y cuya secuencia sería (MGSSFKFGLIGLMGAAVSA).



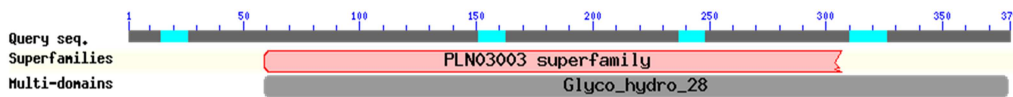
**Figura 47.** Alineamiento de la secuencia de la proteína PG2 de *P. digitatum* con la poligalaturonasa AF195791\_1 de *Penicillium griseoroseum* obtenida con el programa ClustalX. La identidad entre ambas proteínas es del 76 %.

Mediante el servicio online I-TASSER se ha predicho la estructura secundaria de la proteína y se ha obtenido un modelo en 3D de la misma. Dentro de la estructura predicha el 51 % de los aminoácidos forman 30 hojas beta (representadas en color amarillo en la figura 48) y un 5 % de los mismos forman 4 hélices (color rosa). La mayor similitud en el banco de datos de proteínas ya resueltas (PDB-Protein Data Bank) corresponde a una poligalacturonasa de *Aspergillus aculeatus*. El programa predice que los principales ligandos de la misma son N-acetil-D-glucosamina y  $\alpha$ -D-manosa. La predicción de la función nos muestra que corresponde a una poligalaturonasa cuya función es la hidrólisis aleatoria de los enlaces alfa (1->4)-D-galactosidurónico en pectato u otros galacturonanos y que se trata de una proteína extracelular. Por lo tanto, PG2 sería una endopoligalacturonasa extracelular.



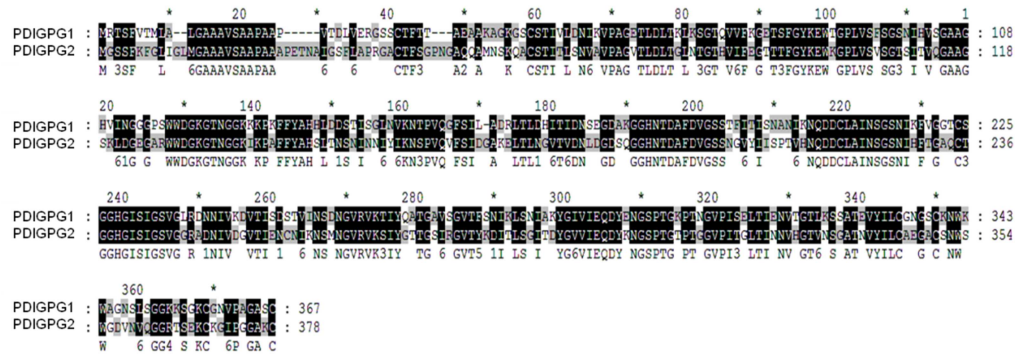
**Figura 48.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PG2 utilizando el programa de predicción I-TASSER. En amarillo se representan las hojas beta y en rosa las hélices alfa.

La proteína PG2 presenta, al igual que ocurría con PG1, posee un dominio típico de la familia glicosil hidrolasas 28 (aa 59-378). También presenta similitud con la superfamilia PLN03003 de poligalacturonasas (Figura 49).



**Figura 49.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína PG2 de *P. digitatum*. Se localizan el motivo glicosil hidrolasa 28, típico de poligalacturonasas, y el dominio de la superfamilia PLN03003, que engloba a muchas poligalacturonasas. Los datos fueron obtenidos desde la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Mediante el programa ClustalX se realizó un alineamiento de las dos poligalacturonasas secuenciadas observándose que poseen una identidad del 51 %, lo que indica que son proteínas claramente diferentes (Figura 50).



**Figura 50.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las dos poligalacturonas PG1 y PG2. El alineamiento se llevó a cabo con el programa *ClustalX*.

### 4.3 Pectin liasa (*pn1*)

La secuencia del gen *pn1* (Figura 51) tiene 1366 pb y presenta cuatro intrones (posiciones 201-256, 401-460, 588-659 y 756-811). La proteína deducida de este gen, designada como PNL1, contiene 374 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 39,02 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5,46. La secuencia de proteínas más similar a PNL1 es la pectin liasa D de *Aspergillus niger* (nº Acceso AAA32701.1) con la que comparte una identidad del 75 %. En la figura 52 se muestra el alineamiento de ambas secuencias. La secuencia comparte un 100% de identidad con la secuencias PDIP\_08080 y PDIG\_03380 de las cepas *P. digitatum* Pd1 y PHI26 respectivamente. También se ha secuenciado 2080 pb de la zona del promotor y 1856 pb de la zona del terminador. No se ha identificado la presencia de algún gen en ninguna de estas dos regiones.

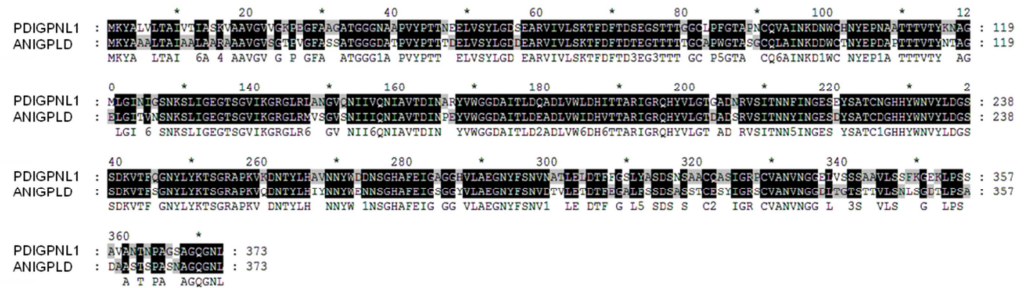
```

-2080 CTAGTTTACCACATGTTTGAATTGATAAGCCACAACAAAGAAAAATCTATGTGAAATCAACGACCGTAGCTTCAATGTTGAGA
-2000 TTCGAAACTCAAACATTCGATCTGATAGTCTCAACTAAGCTTTTACAAATTTTCAATCTATCTTACATTAATAATCATGT
-1920 ACCTCGACTTCTCCTGACCAGTACTTCGTACACTATCCCAAGCCCGGGGTACGGGTACAGCTTTGGTGGCAGGATTAGAA
-1840 ATAGTCAATCTGCCTCATCATGTTACCAAGGTAGATACCTTATTTCCAGTCTCCTGGTTTTTTCGTTACCCATGAAGGCTA
-1760 GTCAGTGTGTTGATGACGTGGCACAAGGGCGTTCATGTAGACCAGTCTGAAGAATGCTGCAGGGCAGGGCGTATATGACGCA
-1680 TAGATAAACACCATATTTACAGTCACTACTACTATCTGCCAAATGCATTCCTTCCGCTGTTCTGATCGTGTCTTGGCAATG
-1600 ATGGAGATTTCTGAAGGCTTCGACAGTGTAGAGGTTTACGTTAGCGCAGTCTTAGTAATTTCTCACACCCAGCTTTCGA
-1520 TCCACTTTAACATCCGCTTTTCCCTCAACTTAAATCAGGTGGCACTCACGAGGGCTCTGTGACAAGGCACACTCGGCAG
-1440 TGGCGGTGATCGGATGACAAATATCATAGAGTGGGGACGCGCATATACAAAGGGGTTCGAATTGACGAAAGGAGAAACG
-1360 TCTCAACGGCTAATCGTGCACAGCACTCACTCAACACACCTTCCCTATGCAAGTTGGTGGGGCCAGTAAACTACAAATTC
-1280 CCACTGAACAAACAGTCTTGAGATTAGGTAACTAATGAAATAGTTAGTTAATTTCTTTTTTGGTGCATACTGATGTACTTGG
-1200 GGTCCAGGGCACAAGGCATCAGGCTTTGCTTGCACCTTATTTGTCAGACCTCTCGTTTTTCCCGTGGGGCATGGAAAA
-1120 ATGTGTGGCGGTAGGTAATTCACAAACTACACATCTCTTCATCTTCTTTAACACAGACATCTTGTTTTTGCGTAC
-1040 ATTTATGGGCCATGAACACAACCTTGTCTAGTCTTCCAAATACACTACTCTAGCTTGTATTTGCACTTCGTTAGTTCGGTAT
-960 GTGCCAAGGCAAGTTTATTTGAAATTTGTTCAACCAAAATTAATGATGGAAATGGTTGGAAATTAATTTGGAAATTAATTTA
-880 ATTTATGCAAAAGCTTTAGTTATGCCCCGGTTCTTATCAAAATGTTGGATCGCGGGCGTAATTTAAAAGTTCAAAAATTC
-800 ACTCTTACTCTGTACCGGGCAGTAAAGGGCATAATTAATAGTATCTCCACGGGACACAACATAGGGCGACCTAATTC
-720 CGGTGCTGGCCGAAAGGAGATTTCTCACTAATTAACCTTGTTCAGATAGAACACCCACAACCTTACTTTTCGATATCGCTT
-640 ACAGAACTTACACAATAGAAACACGTCACACTACTCCCTATGGAGTATCTTCTCAATAATAAGTAGCACCTTAATCTAA
-560 CCCTTATGTTAGCTTTTAAATCAATTCGAAATAGGGCTTACTCAACAAAATTTTAACTTTGGAACTTCGACAGTTAATTTGGG
-480 GAAAACATGAGCATCTACAACTACCTGCACTTTGCTTAATCAAAAACCAATAAATTAAGCACCCGACAGATCTACCAT
-400 TTTCTCTAAACTTCTCTTTGGGCTTTAGGATTTGATTTGGCCGTGTCAATGAGGAGAAATTCGGAAGTGGAGCTCACTGATG
-320 ACCGCTTCCCAAAGCAACCACTGCCACGCACTGATCGGCATTGGCATCTCCACCATCGGGGATTTCTCATCCACGGCTT
-240 CTGAGCCCTATCCACTCTTTATTTTCAAGGTTTGTGAGTAGAGGAGCTAAAGGGGGGAGATGAATGGCGGTAAACAAAGC
-160 CCAATAACCTAAATCCAGATAATTAAGGAAACATCAATTTCTCTCTGTTCCATTTCTCTCCAAATCCATTCATCTTTTGC
-80 TTTTCTCTTTTGTGCTTTACAGTTTCACTTGGCTTTTCGGTTACCGTCACTCTTAAAACCTACTTATTTCCACTCCAAA
1 ATGAAGTACGCACCTTGTTCACCGGCTATTTGTCACCATTGGCTCCAAAGGTGGCGCTGTGCGCGTGTGGTGGCAAACTGA
81 AGGTTCCTGCTGGCGCTACCGTGTGGCAATGGCCCGCTGTGTACCTTACCACCAACGAGGAGCTGGTCTCTTACC
161 TCGGTGACTCGGAGGCCCGTGTCAATTTTCTGAGCAAGACgtgagtaaagagccctgctatggatgagctacggctaac
241 aatggcggactgctagTTTCGACTTCCACCAGAGTGGGGCTCCACCACGACCGGGGTTGCCCTTCTTTCCGGTACTGGC
321 CCAACTGGCAGGTGTGCTATCAACCAAGGACAACCTGGTGGCACAACCTAGGACCAATGGCGCTACCACTCCGTCACCTA
401 gtgagtatcccatcaccggggccataaatcgacttccccttgatgcttacacgtctcacagCAAAAACGCTGGTATGCTCG
481 GTATCAACAATCGGCTCCAAAGTCTTTGATTGGTGGAGGAACTAGCGGTGTATCAAGGGCGTGGTCTGGCCCTTGGC
561 AACGGTGTCCAGAACAATCTCGTCCAGtaagtctaaccatttctcgtttaaagggcgaaagcttcattggaatgtacg
641 ctgattggttcacatagGAACATTGCTGCTGACTGACATCAACGCGCGTACGCTTGGGGTGGTGTATGCTTACCCCTCG
721 ACCAGGCTGACTGGCTTGGCTCGACCACTTACCgtatgttctccccagaccttcccggctataaacatagactgac
801 ctgtcatctagACTGCCCGCAATTGGTGTGCTGAGCACTACGCTCTGGGTACTGGAGCTGCAACCGTGTCTCTATCACCAC
881 AACTTCACTAACCGGTGAACTGAGTACTCGGCCACCTGCAACCGGTCACTACTGGAACTGACTTGTATGGTTCCAG
961 TGCAAGGTCACTTCCAGGGCAACTACTCTTACAAGACTAGTGGCGGTGCACCCAGGTCAGGCAACAACCTACTCTCC
1041 ACCGTGTCAACAACACTCGGGACGCAACTCCGGCCACGCTTTCGAGATCGGCGCTGGTGGCCACGCTCTTGGCCAGGGT
1121 AACTACTTTCCAAACGTCACCGTACTCTCGAGTTGGACACCTTCTTCGGCTTCCCTTACGCTTCCGACAGCAACTCCCG
1201 CGCCTGCCAGGCTTCCATCGGCTCGCCCTGTGTGGCCAACTCAACGGAGAGGCTGGTCAAGCTCTCCGCCCGCGTTC
1281 TGTGAGCTTCAAGGGCGAAGGCTCCCTCTTCTGCTGTGGCAACCAACCTTGTGGCAGGCTGGTCAAGGGCAAC
1361 CTGTAAACATAGTTATGTTTGTGGACTAGGGGATTTCTTCAAAATTTCTTGTGGGAAAATCGGGGCAATTTGCTTCGCTAC
1441 ACCACAGTCTTCGGAGGAGAAACAAGAGAGATCAATACGACTGTATTAGAAAATCTCTGACTGACTGCCCTGGAGGAAAA
1521 GAGGAGAGGAACTATCCAACCTACCCTGCAATTCCTATCAACAATGGGGCCATGGGATCACTCACATCGCATACCTCAAC
1601 CTGGAGAGTCTTAGCATAGTTAATCTTAGTTTAACTCGATTGTTTTTCGAAAAACAGATGCACCTCCATAATTTTGGCCCT
1681 AGTGAACCTGCTCAGTTTTTTCGATTGCTGCTGTTGCTGCTCAATTTATTAATCTCGAACAGTGCAGTGCACATAAGGTATAA
1761 TTTGCAACAACAACAAATCTTAAACAGACTGTTGACGCCATAAACGACCACCAACAACAATTTGGAGCAAAATTTGCT
1841 TCTAGCCCCGTATTAATGATCTCAAGAAAATGTTGGTTTGAAGTAAAGAAATCAGTTGCCCATTTCAATGAAGCTGTTGGA
1921 CAGATTGCTATGAGAGTTCGCTGCTTGTCTAAAATGCAAGTGTACAGGGCCAGTGTATTGAGTTAACTAACAACCCAAAC
2001 CACTTTCAACTCCGATGATTTGCTTTGCTTACGTGGACCGAATTTCTTTAATCTCGGAGTCTCCAGCAGTGGCCCAATCA
2081 CACTACTCTGGTGGTTTTACCACGTCAATCTTTTTTAAATATCGATCGTGGACTGCAACTATCTCCAAAGGAGCTATGTATC
2161 TTTGATATGTTTCTTCTTTGATTAATCCGTTAATCGTATGCTTTATCGACAAATTTGACCTAAGAAATCATCAGAACCCAGAA
2241 CTCGATTAGACACTTCGGGTTCCAGTAGACGGGGTCTTACTAGCGCTGAGCCAGGGGCATACCCACACTTGAAATTTGGTT
2321 ACTGTAACCCCTGTCAAAAACATGAACCTGGCACAAGTAAACCGGCTCTCTTTTATATGTAATGATAAATTTGTAATGATG
2401 AACTCAATAATAGCATGGCGGCACGCTCCCGCTTTAGGTAGGCGGTACAGACTAAAAGTGGCGGTGAGCTGAGTGGGG
2481 CTCTAGGGGGTGTAGAAAATTTCTGTCTCACTGACTTCCGTAATCTCCGATATTTACTAATGTTATGTAGAAAGAACTAG
2561 TCTGTTTTGATTTTGTCTTCTATCATGTAATTTAGATTGGTAAAAGCAGCCAGTTAAGAGATTTTCTCTTAGAATTTTT
2641 TTAGTCTCTAACTACCGAGATGACATTTGCTTTATTTCTATCTTCCACTCCGTTACCAATTACTACCAACGTTCTTTTT
2721 CAAATCTTAATTTGCAATAAGAAAATTCATCTACTCATGTGTTTTGTAAGATGCTCTATCATTTTATCTAATAGCAGT
2801 AAATAATAAGCTGTGAAGAAATAGACGGGCCGAAAGAAATAGAACAGGGACCTGACTTAAAATGGAAGCAAACTTTT
2881 TAGTTAATGAGGATAAAGTTTTTTTTGATAGAAATGGACAAGGCATTTCAATTTGACAGGGGTTACCGTAACAGCTCAAG
2961 GGTGGGTACCTGGCTTAGCACTAGTAAGAACTGGGTGGCCCTAAAAGTTAGGTGGCCCTTCTTAGTTGGGCTATGACAAC
3041 CACAGCAGCAAAATACGAAAAGGCTGAAGTTCAATTTGAATTCACCGCTTCTCATGGCAATGACTAAGAGGATCCCT
3121 GGCAGAAATGGGTTGACTGGAGAGAAGATGCTACGGCCATTAGGTTCTTTACTCTTATCTTACCAAAAACCGCGCTT
3201 ACCTTTTGTGCGAGACGTTGTCG

```

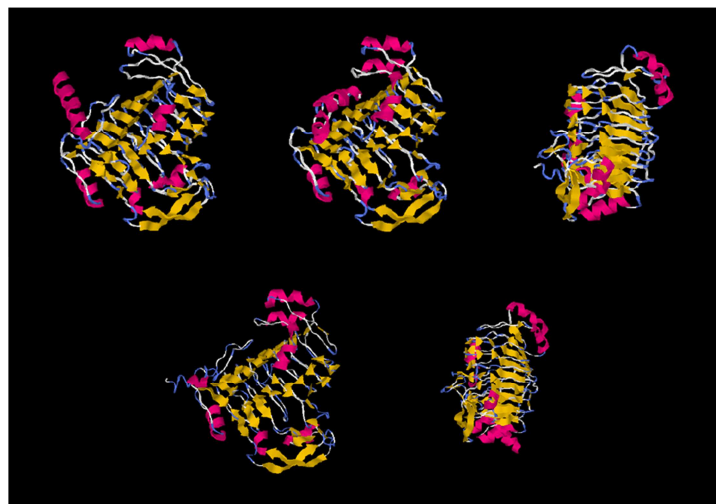
Figura 51. Secuencia completa del gen *pn1* de *P. digitatum*. En rojo se muestran los exones del gen. Dentro de las regiones promotora y terminadora que están marcadas en negro se han localizado parte de la secuencia de otros genes que están marcadas en verde.

El análisis de la estructura primaria de la proteína PNL1 con la aplicación SMART identificó dos dominios de baja complejidad (aa28-40 y aa338-348) y 1 dominio Amb alpha II (aa 94-301), dominio típico de la superfamilia de las pectato liasas. Estas enzimas forman una estructura beta hélice dextrógira y suelen estar involucradas en la maceración del tejido de la planta. El mismo algoritmo muestra la existencia de un posible péptido señal que comprende los 19 primeros aminoácidos y cuya secuencia sería (MKYALVLTAVTIASKVAA).



**Figura 52.** Alineamiento de la secuencia de PNL1 de *P. digitatum* con la pectin liasa D de *A. niger* obtenida con ClustalX.

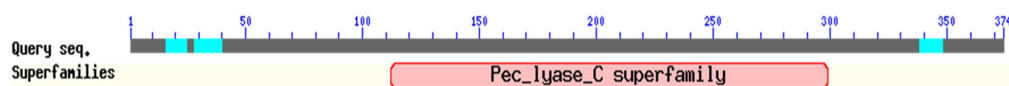
En la figura 53 se muestra un modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PNL1 de *P. digitatum* obtenida utilizando el programa de predicción I-TASSER. Dentro de la estructura predicha, el 41 % de los aminoácidos forman 33 hojas beta (representadas en color amarillo en el gráfico) y un 11 % de los mismos forman 7 hélices (color rosa). La mayor similitud en el banco de datos de proteínas ya resueltas (PDB-Protein Data Bank) corresponde a la pectin liasa A de *A. niger*. La predicción de la función muestra que PNL1 es una pectin liasa, cuya función es la eliminación del enlace alfa (1->4) del metil éster D-galacturonano para generar oligosacáridos con grupos 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. Por lo tanto PNL1 sería una pectin liasa extracelular.



**Figura 53.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína PNL1 utilizando el programa de predicción I-TASSER. En amarillo se representan las hojas beta y en rosa las hélices alfa.



Para obtener una mayor información de la proteína, se realizó una búsqueda de posibles dominios estructurales conservados en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Según los datos obtenidos, la región de la proteína contenida entre los aminoácidos 112 y 299 permitió englobar la proteína dentro de la superfamilia pectato liasa (Figura 54). Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia poseen una estructura de hélice beta levógira. Además todas están involucradas en la maceración y la podredumbre del tejido de la planta.



**Figura 54.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína PNL1 de *P. digitatum*. Se localizó un motivo característico de la superfamilia pectato liasa entre los aminoácidos 112 y 299. Los datos fueron obtenidos desde la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 4.4 Proteína Rieske (*ris1*)

La secuencia del gen *ris1* (Figura 55) tiene 1296 pb y presenta un único intrón (posición 829-882 en la figura 55). La proteína codificada por este gen, a la que denominamos RIS1, tiene 414 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 48,08 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,33. La proteína con mayor similitud a RIS1, con una identidad del 89 %, es una proteína hipotética de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (nº Acceso CAP83006.1), la cual posee todos los dominios característicos de la familia de las proteínas de la familia Rieske. En la Figura 56 se muestra el alineamiento de ambas secuencias. La comparación de la secuencia con las depositadas en la base de datos del NCBI para las dos cepas de *P. digitatum* secuenciadas mostró una identidad del 100 % con la secuencia PDIG\_05470 de PHI26 y 99 % con PDIP\_10140 de Pd1. También se han secuenciado 2100 pb de la zona del promotor, donde se identificó el gen PDIP\_10130 casi completo (posición <1-909) que codifica una proteína muy similar a varios reguladores transcripcionales de hongos filamentosos. Esta proteína contiene el dominio de la superfamilia cl00381 (piridoxina 5' fosfato oxidasa, PNP). Las proteínas que contienen este dominio unen flavin mononucleótidos y catalizan reacciones redox. En los 1589 pb de la zona del terminador se ha identificado el gen incompleto PDIP\_10150 (desde la posición 2129 hasta el final) con un intrón (entre las posiciones 2381-2454) que codifica una proteína con dominio "F-box". Este dominio media la interacción proteína-proteína y está asociadas a funciones celulares tales como la transducción de señales y la regulación del ciclo celular.

```

-2100                                     GATGTGCTGCAAGCGATT
-2080 TAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTGTAAATACGACTCACTATAGG
-2000 GCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCACGTACACAGCACCTAGACCACCTTCTTTCAAAGCGTTCATGAGGAGAAA
-1920 GACAAAAGAGGTCTTGCCTCAATTTCAACCGGCAAAACCCACTCGGGATTTTGTACCCGGGTATGAACCTTCCCAACAAGA
-1840 TTTCTTACAATGCACCCATGCCCATTTGTGGTGGATTTCCCGAGGAAACCGGCAAGCGGGAACCCCTATCTCCCGGCC
-1760 ACATCGCCAAAGCAGAAATCCGCAAGTCAAGACGATGATGGAGGTCGTCGATGACAAAGCCGCCGAACGTTCTTGAACCTGGAC
-1680 AACGACGTCCTTGTGCTCTTCAATGCAAGCACGACCAATTACGTGACTCCGAAATTCATGTGCGAGACCAAGCCAGAAAC
-1600 AGGGAAGGTTGTGCCACATGGAACCTACCTCCGCGTCCAAAGCGTATGGCAAGATGTCGCTATACACGATTCACAAACAC
-1520 CCGAGACCGGCGCATTCCTCAACCAAGCAGCTGCATGATCTTTCGCAACATGCCGAGACGCTCAATCATGGGGTACACTGGT
-1440 GGGCAGAAACCGCAGCGTGGGATGTGTCGAGGGCGCTGACTCGTATATTGATCTCCGAAAGAAGAACATCGTTGGGAT
-1360 TGAGATTGCAATTTACCAAGCTTCAGGGGAAGTTTAAAGTAGCCAGGAAACAGCGAGTTGGGGATCGTGAGGGTGTACATCC
-1280 AGGGTTTTGCAAGGTTGGGAGGTGAGACCGCAATGCGAATTCGAAATTTGGTTAAAGAGCGTGGTACCTGCGTATGCG
-1200 AAGAAATGAGACACTTGTATGATGATGATTAAGATGTAGCACGGGATGCTCATCTTTTAAAGTGTATCCATGGAAATTAC
-1120 TAGTAGATCGAAACCTACCGTGTACATTTGATGTGCTGGCCCTAGACTGAGATTCACCTCCCTCGAAGATGGGTGCAT
-1040 ATTGAAAAAGGAAAAAACAAGATTTTTTTTAAAGAAAGAAATTCATGATGTATTGGCCGTAGCTAGCAGTCTTAATTAAG
-960 GACAGGGCTCGGAGTAGCCGATGTGTTAACCGATCTCATAGCCAATGTACAAGATTCGACCAACTCAAGAGAA
-880 CCCCAGTTACTGGGGGGTGGATCCGTTCACTGTTGGGGATCAGGATCCGGCCGAAATGACAGTGTCTCGTGGCCGTACCTT
-800 GATCCGCAACCCAAAGCCCGTAAGCTGAGCAGCGAAACGAAACGTAACAGCCAAAGAAATGACAGTATCTCAAATGTTGT
-720 AACCCGAGGGACCCCTCTGTGTTCAATGGTGGTACATGTTCTATATTAAAGCTTATCTGTTTCCCTAAATTAATGACCAA
-640 GTAGTTGCCACACCGATACTAGATAATACCCCTAAATAGGGCAAAAGGCCCTATGTCGGAGATTGAGGATTCGCATAGGT
-560 TTTGTTCAAAGATTAGACATGATAAGGGAGGACTATGACAGGCTAAATATTAGTCAAAGGATTGATTTTTCTGATGTAG
-480 TGGGGTTTATGCTTCTCCACAGAGAATCCGAGCTCTCGTATCCATAAAATTCATATAGATCGAAAATTAGGGCTGTG
-400 CAGCTTATTATGCGAGCTTCTATTTGGCCACTTGGCCGATTTGGCGGTTGAAAGCATGCCCCACGAGCACGGATTTGCT
-320 GCCGAGTAGAGGTTGGGTTTGCACAGCGCTGGCCCGATAACCCACCTCTCGCTTAAATCCCCCGCTTGTAGAACGGGT
-240 TGTAGTACGGATTGTAGTGTGTGTTGGCGGGTTGGGGGTTCAATTTCTTTTTTTCGGAAGTTCAACCCGCCGTGGCGAT
-160 GGTTCGCCCTACCAACTAGAACTAGCCGTTCAATATGACCGGGGTATACACATGGCTACCGATCCGATCAAAATTTGTTG
-80 CAGGGCATAAAGAGGTTCTTTCTGATCACCAGTAGAGTATCAAACTTCGAGACAAATTTCCATTTGACTTCTTTCATC
1  ATGACTTCGATGTTCAACTACTTTTGGCTTCAATGCCGCTACCCCAAGAAAGATACCAAGCCCTGCCCTGTTCGTGCTCTT
81  GCCTGCATCATGGTACTCTTCCACGAGATGTATGAACCTGGAGCGCCGAGCCATTTTCTCAAAGAGTGGCTTTATCA
161  CCCACAGCATGCGGTTGAAAGAACCGGTGACTGGCTTCGTTATGAGCTGCAAGGTTTCGATTTTCAATTTACTTCGGCAG
241  CGAGAGGGCAAGATAAACGCAATCCCAACGTGTGCAGACACCGTGCCTACCCGGTCTTTGAGAAAGAGGTTTCGGAAA
321  TTCCAAATCCTCGCTTGTGATACACAGGCTGGTCTACGGACTCAATGGCAAATCGCCAAAGCTGCAAAATACCAAG
401  AGCTGAGCAACTTTCGACAAAGAACGAAACGGACTGTACAAAATCCACCTCAAGGTTGACGCTCAATGGCTTCACTTGGATC
481  AACATGATGCGAAATGAAGTCCCGAGGTATCTTGGGAGGAACACTTCCGCGACGTGCAAGGAAACGAAAGCTTACAAAGC
561  CTACAACCTCAGAACTATGATCTTGACACACCTATGCGCTTCAGGGGCACTATAACTGGAAGATTCTGGCGGCAACT
641  TCAACGAATGTTACCACTGCCCTACGACCCAGCCGATATCCCTGAATTCCTCAACCTCGAATCTTTTCGATAGCGATCTC
721  AAAAGATGGACACTTCAACACACTGCGAATCCACGCCAGAGCAATCCAGAAGGCTTTTACTACTGCCAGCACTATA
801  CTTCCCATGCTGCCATGGTTGTCCTGtaagtttccaactctgtgcttcttaagaaaaacttcgcttaactgctgaca
881  gGCTCATTTTCAATATGATCCAGAAGTTCCCTCCCTCCAGCGCAAGAGCTCCCAAGTGGCTATGAACTTACCGAAG
961  CGAAACTCTTCCGATGCCGACTTTAAGCTTATCAGTGTAGATGTACGCGCGCTCATGGGAGAGACAAAATCCTCTGTAA
1041 CAACGCACAGAAAGACTCCGACCGAAATGCTTCCAAAGTGGTGAAGTTCACCCAGGTGGGAGAAAGGCGCTGTTCTT
1121 TCCAAAGCACAGTCCGCGATGTATCACAGAGCACTTTGAGCGCGAGAAAGCCGCGGGCGGGAGATCTGGCCGCGAAG
1201 CCGAAGTGCATGCAACGCAATCTTAATGAGAAGATGAGCAGATTTGTCGCGCCCTGGCCCTGTGGAGCTCAGAAAGA
1281 GGTTTTGGCGTGGTGAATTTAGGTTTCTCTATCCTGGTTCCTGTAAATTAGTTTATGATGTGTGACTTCTTGTATCT
1361 GATTTTAGCCTTCTCTTTTCACTTTACCATGTCAGCAATGAGATCTTGTTTCAAAGAGCACCAATTTGGCTCTCTTC
1441 ATGTTGGCTATCATGTACATCCATCAGCCGATTTCCACCTTCTTCGACTTCCATTTCTTGGCCCTTCTCATACCGTAA
1521 AATCTCAGCTGGCTGACTGTAGATGTTCCCGTGTGTTTTCTTTTAAAGTCAACTGGCTTCTTCACTACCTCACCGTCT
1601 TCTCGGGACACAGGTGCAAGTGTAAACAAAGTTGACATTTTCAATTCGGTCAATCTCCAGGTGCGAGGGGATCTGGTGTG
1681 GTTGTAAAGCCCTCGTACGGTTAATGATGAGGTTACTTCTAGGGAGGAGGGAAATTAATGTGCGGTTACAGGCACACG
1761 CCGCAGCAAAACAAAGAGCTGTCAATGCTCCGAGAAACAGGCAGACAAATCAGGATACACATGSCATGCAAGAGAA
1841 TGGCAAATTTTCGCACAGGAAGCAAGATAAAAGCGAAAGCAGATCCCTATAAGCTTAGTTGAGCCAAATTAAGGGGAC
1921 GAAAGACCAAAAGAGGCGAAAATCAGCCGCTGCTGAAATGTTGAGACATTTTGGCCGCTCAACACAGCTAACTCCCT
2001 TCTGCCTAAGGATGCTTAGAAAATAGCGCCAAACAACTCCGATCAGGCTTACGCAAGGAGGAAAGATTGATAAGAGGT
2081 CTGATCCATCTTTTCTAATAAAAATTTGATCTCTCATAGCAAAGAGCTGGCCTCAGTCAATTTCCCCCGGAGCTA
2161 CTTGCGATCATACGCTCTTATCGAACACGGAAACCCCTCAAGGCCCTGAGGCTGACAAACCATATGCTATGCTTTCG
2241 AACCACTTATGTTCTCCAAATTTCACTGTACACGACGATAAAAGCTGTGAGGCTTTTCGAAATCTGTTATAACACATA
2321 CGCAGTTGAAAGAACAGGTTCCAAAGATTCCGCTCAATACTGTCGAGGTCGACTATGTAAGTgtagtatgaaactgaggt
2401 ggagcattctgaactactgtcccctcaatggttggtcatatgtagcgcactagGACTCCGATGGGATCCAGAGGACT
2481 TGAGCTACTTTTCAGATGGAAGGAGTCCCTACTATGCTTTCGGAAAAATCCAAACCTTGAAGCGTGTCTTGCCTTCG
2561 ACAAAAACCGCACGGGCGATGACAGTTATAGTGAAGGACCCAGTCACTGATTAACGAGGAAACCACTTCTGGCATGGCTG
2641 AGTGCAGCGCTGGTTACTTTAAAGCGACCAATGAAAGAACTAGGGATCCAGAACCACAGAAATGTGACACCAATCGAAC
2721 AGATCTACAGCAAGTATTTGTGCACATGAGCTCGTTGAGACTGAATGTTTGTCAATGAAATCCGAACCTGCTGCGCTGAAA
2801 ACGAAAATCGAGGTTTGCATAACCCAAAGCTTATCCACAGTTGCAAAAATATGCTCGGATCACTTCTCTC

```

**Figura 55.** Secuencia completa del gen *ris1* de *P. digitatum*. En rojo se muestran los exones del gen. Dentro de las regiones promotora y terminadora, que están marcadas en negro, se ha localizado parte de la secuencia de otros genes que están marcadas en verde.

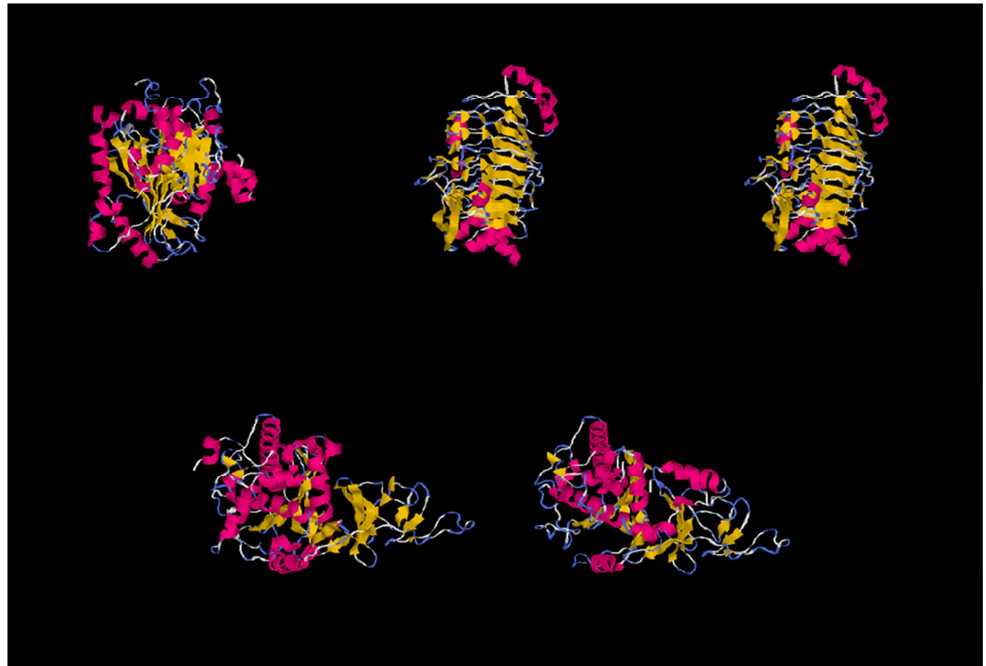
Según la aplicación SMART, la estructura primaria la proteína RIS1 presenta un dominio Rieske (49-144 aa), que es el dominio típico de las proteínas Rieske. Este dominio contiene 3 capas de hojas beta antiparalelas formando dos sandwich beta. El sitio de unión del metal está en la parte superior del sandwich beta formado por las hojas 2 y 3. El átomo de hierro 1

está coordinado por dos cisteínas mientras que el otro átomo de hierro está coordinado por dos histidinas. El mismo programa indica que RIS1 carece de péptido señal.



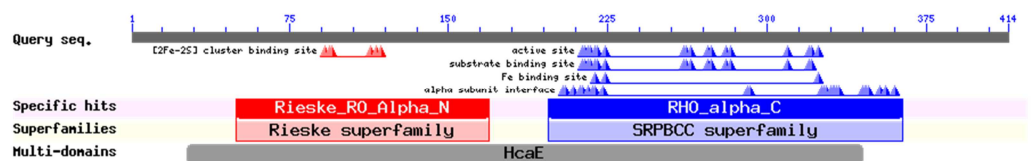
**Figura 56.** Alineamiento de la secuencia de la proteína RIS1 de *P. digitatum* con la proteína hipotética CAP83006.1 de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

A partir de la secuencia de aminoácidos se ha predicho la estructura secundaria de la proteína, observándose que el 24 % de los aminoácidos forman 23 hojas beta (representadas en color amarillo en el gráfico) y un 33 % de los mismos forman 19 hélices (color rosa) (Figura 57). Estos datos se obtuvieron gracias al servicio online I-TASSER. La mayor similitud en el banco de datos de proteínas ya resueltas (PDB-Protein Data Bank) corresponde a una naftaleno 1,2 dioxigenasa. Esta proteína es un sistema multicomponente que contiene una reductasa, una oxigenasa hierro/azufre y una ferredoxina, cuyos ligandos son el ión hierro III y el complejo Fe<sub>2</sub>/S<sub>2</sub>. La función molecular es la de interactuar selectivamente y no covalentemente con un complejo (2Fe-2S), formado por 2 átomos de hierro con 2 átomos de azufre inorgánicos que se encuentran entre los hierros y actúan como ligandos puente. La localización de la proteína corresponde a un componente celular incluido en la membrana o en la pared celular.



**Figura 57.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína RIS1 utilizando el programa de predicción I-TASSER. En amarillo se representan las hojas beta y en rosa las hélices alfa.

La proteína RIS1 de *P. digitatum* se ha clasificado en 2 superfamilias. La zona comprendida entre los aa. 50 a 169 pertenece a la superfamilia Rieske y entre los aa. 197 a 364 a la superfamilia SRPBCC, la cual posee un dominio con un profundo bolsillo hidrofóbico que une diferentes ligandos. Además se ha determinado entre los aminoácidos 27-345 un multi dominio HcaE relacionadas con anillos hidroxilantes de dioxigenasas. Estos datos se han obtenido desde la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Figura 58).

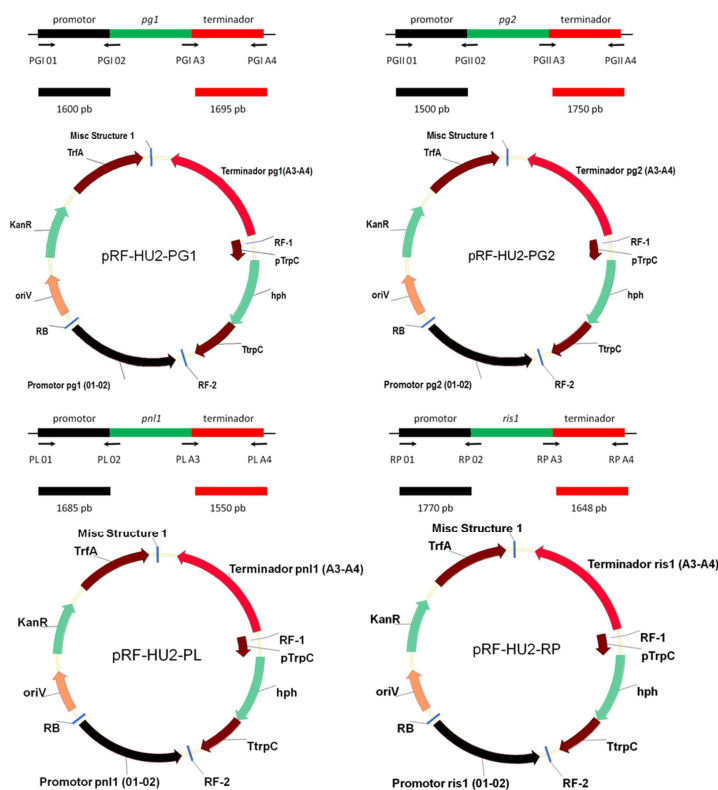


**Figura 58.** Caracterización *in silico* de la estructura de la proteína RIS1 obtenida de *P. digitatum*. Se localizaron dos superfamilias, superfamilia Rieske (aa 50-169) y superfamilia SRPBCC (aa 197-364) y un multi dominio HcaE (aa 27-345). Los datos fueron obtenidos desde la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**4.5 Obtención de mutantes nulos de *P. digitatum* en los genes *pg1*, *pg2*, *pn1* y *ris1***

Tras clonar, secuenciar y analizar la expresión de los genes de interés se procedió a la obtención de cepas mutantes en las que se interrumpió cada uno de estos genes con la finalidad de comprobar *in vivo* su posible implicación en la capacidad de infección de *P. digitatum* sobre frutos cítricos.

Las construcciones necesarias para obtener los mutantes nulos se realizaron de la misma forma como se llevó a cabo la interrupción de gen *ku80*, utilizando el vector pRF-HU2 y la técnica del “USER Friendly cloning” (Figura 59). Se diseñaron oligonucleótidos específicos conteniendo un uracilo por oligonucleótido y se amplificaron los productos de PCR con *Taq* DNA polimerasa, incluyendo en cada uno de los casos más de 1,5 kb tanto de promotor como de terminador, para introducirlos en el vector pRF-HU2 previamente digerido. En la Tabla 15 se muestran los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del fragmento amplificado que se ha insertado en el vector pRF-HU2 y el diseño de cada uno de los vectores construidos. La transformación mediante *A. tumefaciens* se llevó a cabo como se describe en el apartado 10 de Materiales y métodos de esta Tesis.



**Figura 59.** Representación esquemática de los vectores pRF-HU2-RP, pRF-HU2-PL, pRF-HU2-PG1 y pRF-HU2-PG2. Los oligonucleótidos 01 y 02 amplifican el fragmento que corresponde a la región promotora y los oligonucleótidos A3 y A4 el fragmento que corresponde a la región terminadora.

La selección de transformantes se llevó a cabo en medio PDA suplementado con higromicina. El siguiente paso fue diferenciar entre todos los transformantes aquellos en los que tuvo lugar la recombinación homóloga de los que han integrado la construcción ectópicamente (Figura 60). Se utilizaron oligonucleótidos situados dentro de las secuencias utilizadas para las construcciones que flanquean al casete de higromicina, un oligonucleótido está situado en el promotor y otro en el terminador (Tabla 15). Estos oligonucleótidos también están presentes en la cepa silvestre, en el locus del gen, flanqueando la región codificante del gen. En un transformante en el que haya ocurrido recombinación homóloga se obtendrá un amplificado de PCR correspondiente al tamaño del casete de higromicina presente en el T-DNA del plásmido, mientras que si ha habido integración ectópica se obtendrán dos bandas de distinto tamaño: una correspondiente a la copia original del gen y otra correspondiente al casete presente en el plásmido. En la Tabla 15 se muestran los oligonucleótidos utilizados para cada gen así como el tamaño de los dos posibles amplicones, que sirven para diferenciar los transformantes que han eliminado la copia original del gen de los que se han integrado ectópicamente.

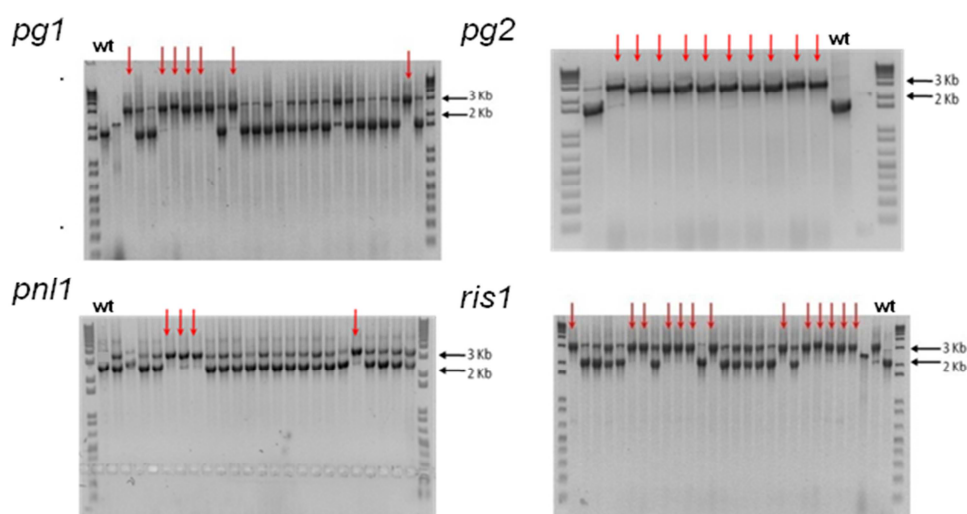
**Tabla 15.** Oligonucleótidos utilizados para diferenciar entre transformantes de delección y ectópicos de los distintos genes.

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño amplicón delección	Tamaño amplicón locus original
<i>ris1</i>	RP-A5	3312 pb	2230 pb
	RP-S6		
<i>pg1</i>	PGI-A7	3385 pb	1863 pb
	PGI-S7		
<i>pg2</i>	PGII-A6	3031 pb	1697 pb
	PGII-S4		
<i>pn1</i>	PL-A5	3741 pb	2207 pb
	PL-S6		

En la Tabla 16 se muestra el número de transformantes analizados para cada gen indicando el número en los que tuvo lugar la delección del mismo por recombinación homóloga. El porcentaje de recombinación homóloga obtenido se situó entre el 10 %, observado con el gen *pg2*, y el 26 % obtenido con el gen *ris1*, del cual se obtuvieron 13 presuntos transformantes.

**Tabla 16.** Análisis de los transformantes. Número de transformantes analizados para cada uno de los genes, mutantes nulos obtenidos y el porcentaje de recombinación homóloga obtenido.

Gen	Transformantes analizados	Mutantes nulos	% de recombinación homóloga
<i>pg1</i>	50	8	16
<i>pg2</i>	96	10	10
<i>pn1</i>	56	6	11
<i>ris1</i>	50	13	26



**Figura 60.** Comprobación de los transformantes de *P. digitatum* mediante PCR para cada uno de los genes *pg1*, *pg2*, *pnl1* y *ris1*. La flecha roja indica los transformantes en los que ha tenido lugar recombinación homóloga. El resto de transformantes son ectópicos, ya que se obtienen dos bandas, una correspondiente a la copia original del gen y otra correspondiente al casete presente en el plásmido. Como wt (wild type) se indica la carrera en la que está presente la cepa parental.

#### 4.5.1 Comprobación del número de copias de los transformantes mediante PCR tiempo real

Para cada gen se seleccionaron varios transformantes en los que se había producido la delección del gen con el fin de comprobar mediante PCR en tiempo real si además de la copia que sustituye al gen de interés se habían integrado copias adicionales del T-DNA de forma ectópica. Para ello se siguió la misma metodología ya descrita en el apartado 1.4 de Resultados con los transformantes de *ku80*. Los oligonucleótidos se diseñaron en la región promotora de cada uno de los genes.

Se hizo una curva estándar tanto para todos los genes de interés como para el gen que codifica la  $\beta$ -tubulina, que se seleccionó como control. Se utilizó como molde en la reacción diluciones seriadas de una mezcla de los DNAs de todos los transformantes que iban a ser analizados, incluyendo DNA de la cepa silvestre que sirve como control de copia única de ambos genes. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para el cálculo de la eficiencia se utilizó el método de dilución del estándar en el cual la pendiente de la curva estándar proporciona la eficiencia (Eficiencia =  $10^{-1/\text{pendiente}}$ ). La eficiencia para el gen *pg1* fue de 1,955, para el gen *pg2* fue de 2,033, para el gen *ris1* fue de 1,923 y 2,003 para el gen *pnl1*, mientras que para la  $\beta$ -tubulina 1,979, en todos los casos dentro del rango comúnmente aceptado de

1,8-2,0. Una vez se comprobó que la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos era adecuada, se utilizó el método del  $\Delta\Delta C_p$  para estimar el número de copias de cada gen, tal y como se detalló anteriormente en el análisis de los transformantes de delección del gen *ku80*.

Según los datos obtenidos en las curvas para el cálculo de la eficiencia se tomó una cantidad de cada muestra de 10 ng, analizando por duplicado cada una de las muestras. En la Tabla 17 se muestran los resultados de la PCR en tiempo real en la cual se observó que los 4 transformantes de *pg1* (*pg1-3*, *pg1-6*, *pg1-8* y *pg1-10*), los 4 de *ris1* (*ris1-1*, *ris1-7*, *ris1-10* y *ris1-19*) así como los transformantes *pg2-0* y *pg2-13* de *pg2* y *pnl1-6* y *pnl1-7* de *pnl1* tenían un  $\Delta C_p$  igual al de la cepa silvestre y por lo tanto no tenían ninguna copia extra del T-DNA. Los transformantes *pg2-10* y *pg2-11* de *pg2* y *pnl1-18* y *pnl1-11* de *pnl1* presentaban un valor de  $\Delta C_p$  menor que la cepa silvestre en un ciclo, lo que indica que tienen la copia truncada y otra más.

El valor de  $\Delta C_p$  de los transformantes ectópicos de *pg1* (*pg1-5* y *pg1-6*) indica que tienen 2 copias del gen, por lo que estos mutantes presentan una única integración ectópica del T-DNA, ya que una copia corresponde a la del locus de la cepa original. De los transformantes ectópicos de *pg2* (*pg2-3* y *pg2-5*) el valor de  $\Delta C_p$  de ambos indica que tienen 4 y 2 copias del gen, por lo que estos mutantes presentan tres y una integración ectópicas del T-DNA respectivamente. De los transformantes ectópicos de *ris1* (*ris1-12* y *ris1-18*) el valor de  $\Delta C_p$  de ambos indica que tienen 6 y 3 copias del gen, por lo que estos mutantes presentan cinco y dos integraciones ectópicas del T-DNA, respectivamente. Y de los transformantes ectópicos de *pnl1* (*pnl1-9* y *pnl1-10*) el valor de  $\Delta C_p$  de ambos indica que tienen 2 copias del gen, por lo que estos mutantes presentan una integración ectópica del T-DNA respectivamente (Tabla 17).

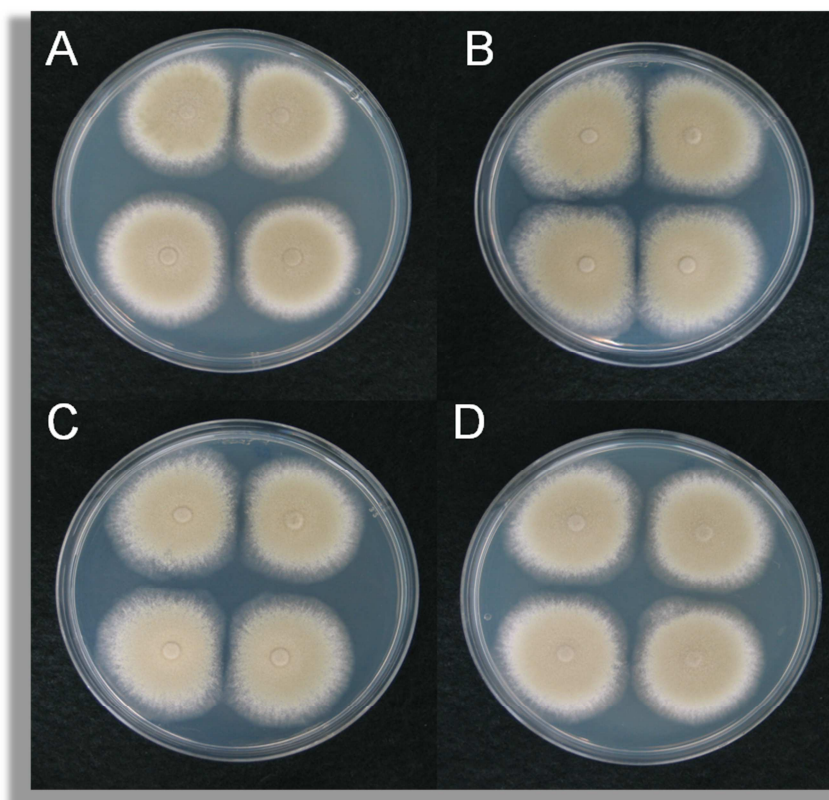


**Tabla 17.** Determinación mediante PCR en tiempo real del número de copias de T-DNA que se han integrado en cada transformante. Se comparan directamente los valores de Cp del gen problema (*pg1*, *pg2*, *ris1* o *pnl1*) y del gen de referencia (*βtub*) ( $\Delta$ Cp) en cada muestra, del que se obtiene el número de copias de T-DNA.

Gen	Cepa	$\Delta$ Cp ( <i>gen diana</i> - <i>βtub</i> )	nº copias gen diana	Tipo de mutante
<b><i>pg1</i></b>	PD1 (wt)	1,12	1	
	<i>pg1</i> -3	0,95	1	delección
	<i>pg1</i> -6	0,95	1	delección
	<i>pg1</i> -8	1,00	1	delección
	<i>pg1</i> -10	0,91	1	delección
	<i>pg1</i> -5	0,11	2	ectópico (1 copia T-DNA)
	<i>pg1</i> -6	-0,06	2	ectópico (1 copia T-DNA)
	<b><i>pg2</i></b>	PD1 (wt)	-0,41	1
<i>pg2</i> -0		-0,57	1	delección
<i>pg2</i> -10		-1,93	2	delección + 1 copia ectópica
<i>pg2</i> -11		-2,00	2	delección + 1 copia ectópica
<i>pg2</i> -13		-0,55	1	delección
<i>pg2</i> -3		-3,24	4	ectópico (3 copia T-DNA)
<i>pg2</i> -5		-1,44	2	ectópico (1 copia T-DNA)
<b><i>ris1</i></b>		PD1 (wt)	0,83	1
	<i>ris1</i> -1	0,83	1	delección
	<i>ris1</i> -7	0,92	1	delección
	<i>ris1</i> -10	0,89	1	delección
	<i>ris1</i> -19	0,87	1	delección
	<i>ris1</i> -12	-1,73	6	ectópico (5 copias T-DNA)
	<i>ris1</i> -18	0,27	3	ectópico (2 copia T-DNA)
	<b><i>pnl1</i></b>	PD1 (wt)	-0,01	1
<i>pnl1</i> -6		-0,01	1	delección
<i>pnl1</i> -7		-0,03	1	delección
<i>pnl1</i> -18		-1,22	2	delección + 1 copia ectópica
<i>pnl1</i> -11		-1,14	2	delección + 1 copia ectópica
<i>pnl1</i> -9		-1,19	2	ectópico (1 copia T-DNA)
<i>pnl1</i> -10		-1,15	2	ectópico (1 copia T-DNA)

#### **4.6 Análisis morfológico de los mutantes nulos $\Delta$ pg1, $\Delta$ pg2, $\Delta$ pnl1 y $\Delta$ ris1 de *P. digitatum***

Para completar la caracterización de los transformantes obtenidos, se determinó si la delección de los genes afectaba al desarrollo, morfología o crecimiento. En una primera aproximación se sembraron en placas de PDA varios transformantes de cada gen, tanto de los mutantes de delección como de un transformante ectópico junto con el aislado Pd1 de *P. digitatum*. Como se muestra en la Figura 61 después de 5 días de incubación a 24 °C no se observaron diferencias entre ninguno de los transformantes analizados en relación a la cepa silvestre en ninguno de los genes estudiados.



**Figura 61.** Crecimiento en medio sólido PDA de los transformantes de *P. digitatum*. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 24 °C. Desde la parte superior izquierda y en sentido horario aparecen: A. aislado Pd1 de *P. digitatum*, los mutantes nulos  $\Delta pg1-8$  y  $\Delta pg1-10$  y el transformante ectópico *pg1-5* (ectópico). B. aislado Pd1 de *P. digitatum*, los mutantes nulos  $\Delta pg2-0$  y  $\Delta pg2-13$  y el transformante ectópico *pg2-5* (ectópico). C. aislado Pd1 de *P. digitatum*, los mutantes nulos  $\Delta ris1-10$  y  $\Delta ris1-19$  y el transformante ectópico *ris1-19* (ectópico). D. aislado Pd1 de *P. digitatum*, los mutantes nulos  $\Delta pnl1-6$  y  $\Delta pnl1-7$  y el transformante ectópico *pnl1-9* (ectópico).

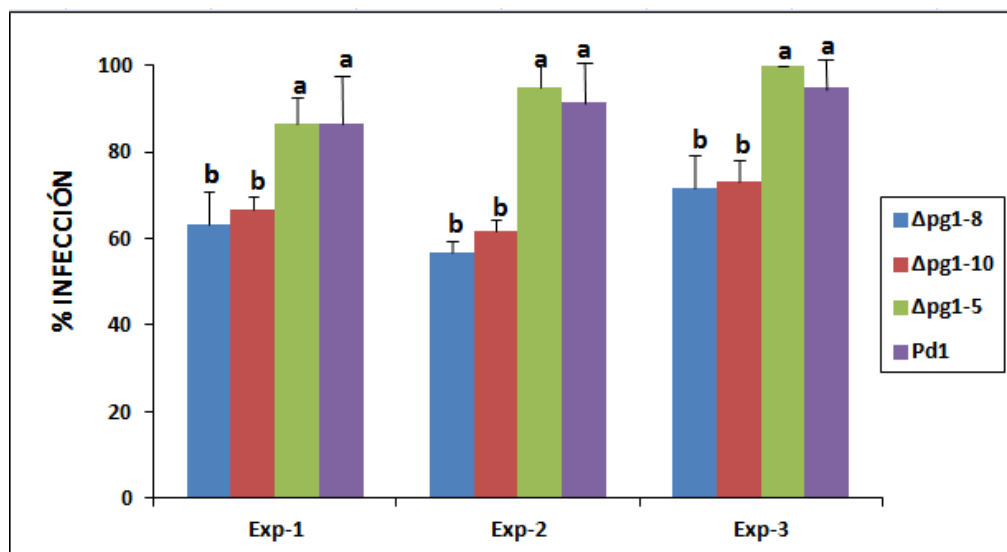
#### **4.7 Ensayos de infección de los mutantes nulos $\Delta pg1$ , $\Delta pg2$ , $\Delta pnl1$ y $\Delta ris1$ de *P. digitatum***

Para evaluar el efecto de cada uno de los genes analizados en la patogenicidad de *P. digitatum* sobre frutos de naranja, se realizaron ensayos de infección controlada tal como se indica en el apartado 2 de Materiales y Métodos de esta Tesis en frutos de naranja “Lane Late”.

Todas las infecciones se llevaron a cabo con una dosis de inóculo de  $10^4$  conidios/mL, tanto para los transformantes como para el control del aislado de *P. digitatum* Pd1. Este inóculo produce una cinética de infección lo suficientemente lenta para poder observar claramente cambios en la misma. Para este ensayo se utilizaron tres cepas transformantes de cada uno de los genes; dos de ellas fueron mutantes nulos que no presentaban copias adicionales del

T-DNA y la tercera cepa correspondió a un mutante de integración ectópica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) en cada experimento de forma independiente.

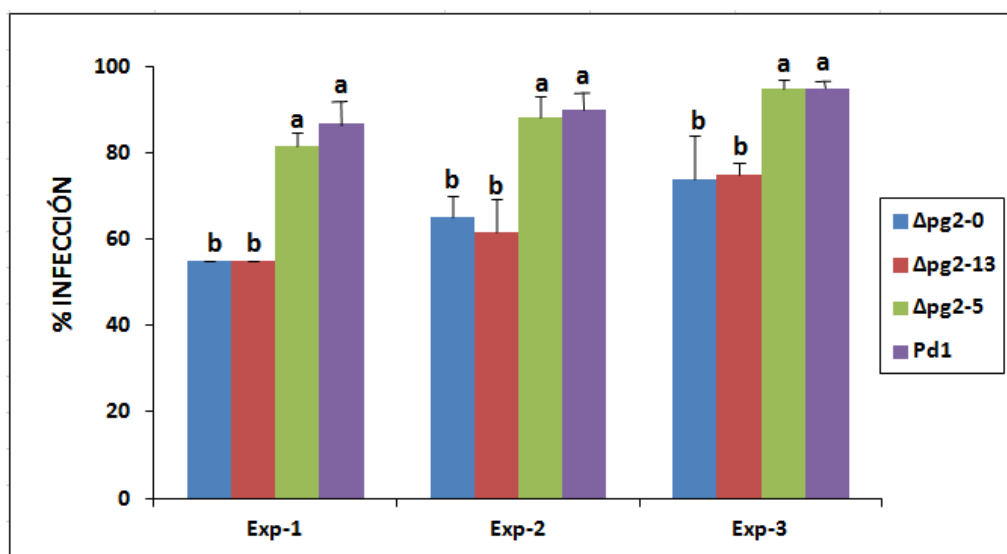
En la Figura 62 se muestran los resultados obtenidos en los tres experimentos realizados con los transformantes nulos del gen *pg1* con respecto al control del aislado Pd1 de *P. digitatum*. En los dos transformantes nulos ( $\Delta pg1-8$ ,  $\Delta pg1-10$ ) se vió afectada a la capacidad de infección con una reducción de la virulencia del 25 % con respecto a la cepa silvestre, mientras que el transformante ectópico (*pg1-5*) presenta la misma virulencia que la cepa parental. Por lo tanto, *pg1* está claramente involucrado en el proceso de patogénesis.



**Figura 62.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja “Lane Late” inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para el gen *pg1*. Los transformantes  $\Delta pg1-8$  y  $\Delta pg1-10$  son mutantes de delección del gen *pg1* y  $\Delta pg1-5$  es un mutante ectópico, mientras que Pd1 es la cepa parental. Las medidas de la infección se realizaron a día 5 tras la inoculación. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de forma independiente para cada experimento. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

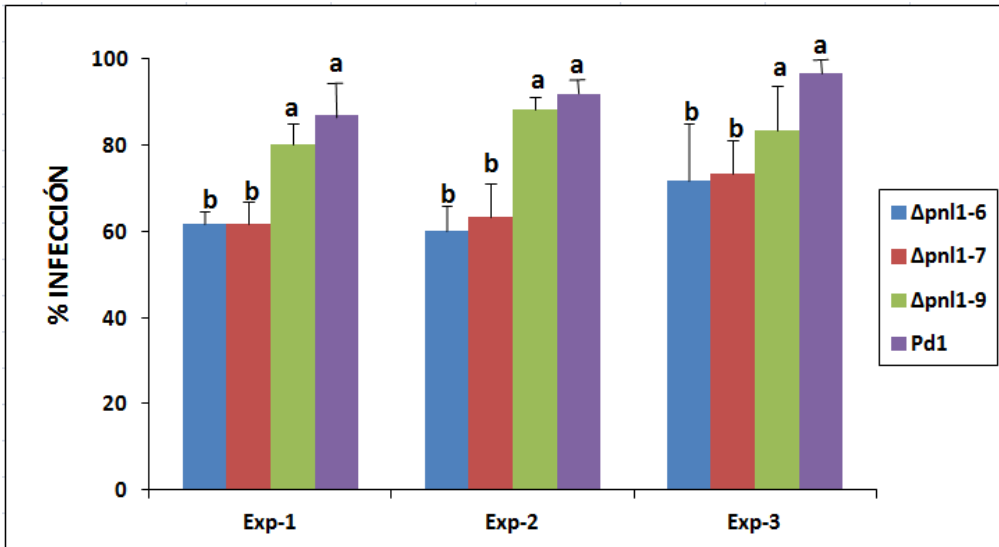
Para los transformantes del otro gen que codifica una poligalacturonasa (*pg2*), en los tres experimentos realizados se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con los transformantes de *pg1*. En la Figura 63 se observa que en los dos transformantes nulos  $\Delta pg2$  ( $\Delta pg2-0$  y  $\Delta pg2-13$ ) la capacidad de infección se vió disminuida en un 25 % con respecto al control del aislado Pd1 de *P. digitatum*, reducción que no ocurre en el transformante ectópico (*pg2-5*). Es de destacar además que los deletantes de *pg2* han perdido parcialmente la capacidad de maceración del tejido, ya que el tejido por el cual se extiende la infección se

mantiene duro en comparación con el reblandecimiento que se produce normalmente por efecto de la invasión del hongo.



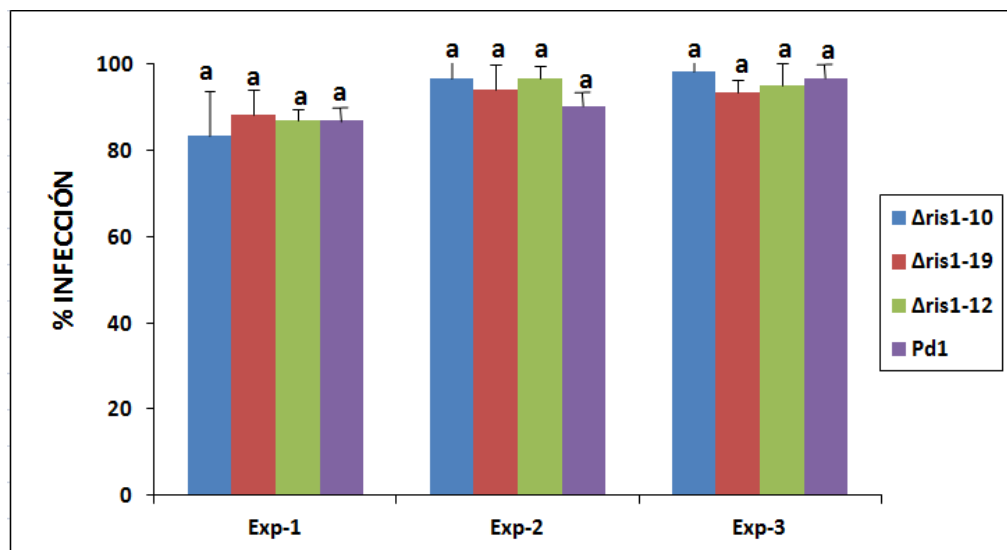
**Figura 63.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja “Lane Late” inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para el gen *pg2*. Los transformantes  $\Delta pg2-0$  y  $\Delta pg2-13$  son mutantes de delección del gen *pg2* y  $\Delta pg2-5$  es un mutante ectópico, mientras que Pd1 es la cepa parental. Las medidas de la infección se realizaron a día 5 tras la inoculación. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de forma independiente para cada experimento. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Del mismo modo que se observó en los mutantes nulos en los dos genes que codifican poligalacturonasas, los dos transformantes nulos de *pnl1* ( $\Delta pnl1-6$  y  $\Delta pnl1-7$ ) presentaron una reducción del 20 % de infección respecto al control del aislado Pd1 de *P. digitatum*, como se muestra en la Figura 64. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de este gen en el proceso de infección. En los tres experimentos realizados se obtuvieron resultados muy similares. Además en el transformante ectópico (*pnl1-9*) no se vió alterada la capacidad de infección.



**Figura 64.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja "Lane Late" inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para el gen *pnl1*. Los transformantes  $\Delta pnl1-6$  y  $\Delta pnl1-7$  son mutantes de delección del gen *pnl1* y  $\Delta pnl1-9$  es un mutante ectópico, mientras que Pd1 es la cepa parental. Las medidas de la infección se realizaron a día 5 tras la inoculación. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de forma independiente para cada experimento. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Con respecto a los transformantes del gen que codifica la proteína Rieske, en los tres experimentos realizados tanto con los transformantes nulos ( $\Delta ris1-10$  y  $\Delta ris1-19$ ) como con el transformante ectópico ( $\Delta ris1-12$ ) no se observaron diferencias en el porcentaje de infección respecto al control del aislado Pd1 de *P. digitatum* (Figura 65).



**Figura 65.** Incidencia (%) de la infección en frutos de naranja “Lane Late” inoculados con transformantes deletantes de *P. digitatum* para el gen *ris1*. Los transformantes  $\Delta ris1-10$  y  $\Delta ris1-19$  son mutantes de delección del gen *ris1* y  $\Delta ris1-12$  es un mutante ectópico, mientras que Pd1 es la cepa parental. Las medidas de la infección se realizaron a día 5 tras la inoculación. Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje de infección  $\pm$  SD. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de forma independiente para cada experimento. Muestras con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).



**DISCUSIÓN**

---



*P. digitatum*, agente causal de la podredumbre verde, es el principal patógeno de cítricos durante el manejo y almacenamiento de frutos cítricos durante la postcosecha en las regiones de clima mediterráneo, siendo responsable de hasta el 80 % de las pérdidas debidas a podredumbres (Tuset, 1987). Este hongo necrótrofo posee un rango de huésped muy restringido, infectando únicamente frutos cítricos. A pesar de la importancia económica de este hongo, nuestro conocimiento sobre sus mecanismos de patogenicidad es todavía muy limitado, a diferencia del avance experimentado en los últimos años en el conocimiento de las respuestas de defensa del fruto frente la infección por este patógeno. Actualmente, el control de esta enfermedad se lleva a cabo mediante la aplicación de fungicidas químicos. Los benzimidazoles, tales como carbendazima, tiabendazol y metil-tiofanato, han sido utilizados para el control de la podredumbre verde durante muchos años. Éstos han ido siendo gradualmente remplazados por imazalil y procloraz debido a la aparición generalizada de resistencias a los benzimidazoles en *P. digitatum* (Zhu *et al.* 2006). En la actualidad, y debido al uso continuado del imazalil, la eficiencia del control también se ha visto comprometida (Kinay *et al.* 2007). Esta problemática, unida al incremento de la conciencia por parte de los consumidores acerca de los riesgos para la salud y el medio ambiente que puede traer consigo el uso de fungicidas y a que los países importadores exigen cada vez menores niveles de plaguicidas en los productos agrícolas, ha derivado en la necesidad de encontrar alternativas al uso de productos químicos para solucionar los problemas de conservación de frutas y vegetales. El desarrollo de estas estrategias alternativas para el control de la podredumbre verde está siendo más costoso de lo esperado, ya que hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento alternativo que por sí solo iguale la eficacia de los fungicidas de síntesis química. Aunque hay un cierto interés en los mecanismos que conducen a la aparición de resistencias a fungicidas en *P. digitatum*, apenas existen estudios relacionados con los mecanismos de patogenicidad, tema que constituye el objetivo primario de esta Tesis. Este conocimiento podría aportar pistas importantes como paso previo que nos permita el diseño racional de una estrategia nueva y más segura de control que pueda desembocar en métodos perdurables de control. Para poder llevar a cabo el estudio de los mecanismos de patogenicidad de *P. digitatum* es necesario disponer de un conjunto de herramientas genómicas y moleculares, que aún no están disponibles para este hongo. El desarrollo de este conjunto de herramientas constituye un paso previo en la identificación y caracterización funcional de genes involucrados en patogenicidad/ virulencia.

### **1. Desarrollo de herramientas genómicas para *P. digitatum***

Un factor esencial en el avance de las técnicas de DNA recombinante ha sido el desarrollo de sistemas de transformación genética. Los sistemas de transformación constituyen una parte esencial de la investigación moderna en hongos y tienen una gran importancia en aplicaciones en muchas especies de hongos usadas en biotecnología y en especies patógenas tanto de plantas como de animales. Por esta razón, uno de los principales objetivos de esta Tesis fue el desarrollar un sistema de transformación para *P. digitatum*.

Desde el primer estudio llevado a cabo con éxito en la transformación mediada por protoplastos de *S. cerevisiae* (Hinnen *et al.* 1978), el uso de la transformación se ha

extendido a varios hongos filamentosos (Fincham, 1989; Ruiz-Diez, 2002). Sin embargo, generalmente la frecuencia de transformación es extremadamente baja en comparación con los rendimientos obtenidos con *S. cerevisiae*. Con el fin de mejorar la transformación de los hongos filamentosos se han establecido métodos alternativos, como la utilización de protoplastos tratados con CaCl<sub>2</sub>/polietilenglicol, electroporación, bombardeo de partículas o transformación mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) (Weld *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2008). Cada uno de estos métodos posee sus ventajas e inconvenientes.

La transformación de protoplastos usando CaCl<sub>2</sub>/polietilenglicol (PEG), aunque usada ampliamente, posee una limitación importante, ya que este método requiere de la producción de protoplastos, un proceso muy inconsistente ya que las condiciones óptimas de obtención de protoplastos varían entre lotes distintos del mismo preparado enzimático. En la transformación mediante bombardeo de partículas, el tejido intacto del hongo es bombardeado con bolas de oro o de tungsteno recubiertas con el DNA transformante. Se utiliza en sistemas donde la producción de protoplastos no ha sido desarrollada. Algunos investigadores han demostrado una frecuencia de transformación y una estabilidad mitótica similar o mayor a la obtenida con la transformación mediada por protoplastos.

La tendencia actual en la transformación de hongos filamentosos se centra en la utilización de la bacteria *A. tumefaciens* con la denominada ATMT. Meyer y colaboradores (2003) mostraron que el empleo de la ATMT produjo la integración estable en los transformantes y altos niveles de transformación en comparación con las otras técnicas de transformación. Bajo las condiciones adecuadas, *A. tumefaciens* puede transferir el T-DNA a un amplio rango de hongos. Algunos hongos que se han mostrado recalcitrantes con otros sistemas de transformación han sido finalmente transformados mediante coincubación con *Agrobacterium*. ATMT es un sistema simple para poder trabajar, ya que no requiere la obtención de protoplastos, y puede ser utilizada tanto para mutagénesis dirigida (recombinación homóloga) como para mutagénesis al azar (integración aleatoria) (Combiér *et al.* 2003). Por estos motivos se decidió desarrollar un sistema de transformación de *P. digitatum* mediado por *A. tumefaciens*. En este sentido, durante el desarrollo de esta Tesis, Wang y Li (2008) han publicado el primer trabajo que describe la transformación de *P. digitatum* usando ATMT.

Se puso a punto el sistema de ATMT utilizando como marcador de selección de los transformantes el gen *hph* (resistencia a higromicina B). El gen de la higromicina B fosfotransferasa (*hph*) es de origen bacteriano y se ha utilizado con éxito como marcador de selección en diversas especies de hongos patógenos de interés, entre ellas *M. grisea* (Leung *et al.* 1990), *F. moniliforme* (Leslie y Dickman 1991) y en muchos otros casos (Frandsen 2011). Los ensayos de sensibilidad realizados con varias concentraciones de higromicina B mostraron que *P. digitatum* no podía crecer con una concentración mayor o igual a 100 µg/ml. Por lo tanto, 100 µg/mL fue considerada la concentración mínima inhibitoria de higromicina para la selección de transformantes de *P. digitatum* en los experimentos de ATMT.

La eficiencia de la transformación fue comparada usando tres cepas diferentes de *A. tumefaciens*. Hubo diferencias en las eficiencias de transformación entre ellas. Para *P.*

*digitatum*, la cepa AGL-1 se mostró como la más eficiente de las tres cepas. Contrariamente, la eficiencia de transformación de la cepa LBA4404 fue menor que las otras dos. Queda claro que con las cepas del tipo succinamopinas (EHA 105 y AGL-1), las cuales fueron construidas como cepas de *A. tumefaciens* super virulentas (Hood *et al.* 1993), se obtuvieron más transformantes que con la cepa octopina (LBA 4404). Zhang y colaboradores (2008) obtuvieron los mismos resultados en otro hongo del mismo género, *P. marneffeii*, al comparar la eficiencia de transformación de las cepas de *A. tumefaciens* EHA 105 y LBA 4404. Del mismo modo, en otros hongos fitopatógenos como *Cryphonectria parasitica*, y *Rosellinia necatrix*, la cepa *Agrobacterium* AGL-1 fue más eficiente en la transformación que LBA 4404 (Park *et al.* 2004; Kano *et al.* 2011), lo que sugiere que la diferencia en la eficiencia de transformación puede ser debido al fondo genético de las cepas de *Agrobacterium*.

Se observó una buena estabilidad mitótica de los transformantes tras varias generaciones en ausencia de presión selectiva (Figura 13). Las únicas desventajas de este sistema con respecto a los otros sistemas son que este método requiere un mayor tiempo de procesamiento y que hay varios parámetros que afectan a la transformación durante el periodo de coincubación. Para establecer las condiciones óptimas de transformación se llevaron a cabo diferentes ensayos variando la temperatura y tiempo de coincubación, así como con la concentración de conidios. Una vez que se optimizó el sistema de transformación se consiguió una buena reproducibilidad y una alta frecuencia de transformantes. La eficiencia de transformación obviamente aumentó cuando la concentración de conidios de *P. digitatum* que se utilizó en la co-incubación aumentó de  $10^5$  a  $10^6$  o  $10^7$  conidios/mL, de tal modo que se tuvo que elegir la concentración más baja de todas las ensayadas ( $10^5$  conidios/mL) para los experimentos como único medio para poder obtener transformantes individuales fácilmente distinguibles ya que con cantidades mayores de conidios se obtuvieron muchos transformantes, que crecían confluentemente. Todos estos resultados hacen de la ATMT una herramienta muy factible para la manipulación genética de *P. digitatum*.

### **1.1 Uso de la proteína verde fluorescente para el estudio de *P. digitatum***

Una vez puesto a punto el sistema de transformación de *P. digitatum* se procedió a la transformación del hongo mediante la cepa AGL-1 de *A. tumefaciens* con el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La importancia de esta proteína como marcador se debe a sus cualidades únicas de absorber luz con un máximo a longitudes de onda de 395 y 475 nm y emitir luz con un máximo a 508 nm. La principal ventaja de la GFP es que no requiere sustratos exógenos ni tratamientos de permeabilización de las células. Esta característica no solamente permite la observación de células vivas en condiciones de perturbación mínima, sino que también facilita el seguimiento directo de procesos intracelulares. Todo esto hace a la GFP un marcador ideal para el estudio de las interacciones hongo-planta. En un primer ensayo se llevó a cabo la transformación de *P. digitatum* con la versión original del gen *gfp* y no se observó fluorescencia alguna en los transformantes. Este fenómeno ha sido observado en otros hongos filamentosos. En 1996, Spellig y colaboradores comprobaron que la versión nativa de GFP no era funcional en *U. maydis*, mientras que una versión modificada sí que lo era.

Por este motivo se utilizaron las versiones *sgfp* y *egfp* para la transformación de *P. digitatum*. Fernández-Ábalos y colaboradores (1998) estudiaron la expresión en *A. nidulans* de cuatro variantes de *gfp* con el mismo promotor y concluyeron que la variante sGFP, que posee la mutación S65T, permitía alcanzar un alto nivel de concentración de GFP y de fluorescencia en los transformantes. Ésta ha sido la versión más usada en la transformación de hongos filamentosos. La otra versión que también dio buenos resultados fue eGFP, que es similar a sGFP pero difiere en que posee una substitución más, en el aminoácido 64 cambia una Phe por una Leu. Esta versión ha sido utilizada con éxito en varios hongos filamentosos como *A. flavus*, *M. grisea* y *Podospora anserina* (Berteaux-Lecellier *et al.* 1998, Du *et al.* 1999, Liu *et al.* 1999). Nuestros ensayos mostraron que ambas variantes de GFP mostraban fluorescencia en *P. digitatum*, aunque la versión sGFP producía una mayor fluorescencia que la variante eGFP (Figura 15). Esto puede ser debido a que realmente, como se ha indicado en bibliografía, la variante sGFP produzca mayores niveles de fluorescencia, pero no se puede afirmar con rotundidad, ya que la expresión de estos genes no se llevó a cabo con el mismo promotor y la variación observada puede ser también debida a la diferencia en los promotores empleados. La cepa silvestre no mostró ninguna fluorescencia de fondo.

La transformación con la proteína verde fluorescente es una importante herramienta para el estudio de hongos filamentosos. Esta proteína no sólo ha sido utilizada para la visualización de las estructuras del hongo sino que también puede fusionarse transcripcionalmente, para evaluar la expresión de genes, y traduccionalmente, para estudiar la localización celular de las proteínas. En hongos fitopatógenos, además puede resultar de gran interés para conocer la expresión durante el proceso de infección de posibles genes implicados en patogénesis y poder conocer su implicación en determinadas etapas de la enfermedad (Lorang *et al.* 2001).

Para poder realizar estos estudios es esencial evaluar las características de crecimiento, esporulación y virulencia de los mutantes que expresan constitutivamente GFP, ya que es importante que el comportamiento de los transformantes sea igual al de la cepa silvestre para poder extrapolar los resultados. No se observaron cambios ni en la morfología de las colonias ni en la forma o tamaño de las hifas y conidios de los transformantes de GFP cuando se compararon con la cepa silvestre en un medio no selectivo. Del mismo modo, el ritmo de crecimiento tampoco se vio afectado, a diferencia de lo que se ha descrito en otras especies de hongos en las que no habiéndose observado diferencias en la morfología sí que se observó un ritmo de crecimiento ligeramente menor en los transformantes de GFP comparados con la cepa silvestre (Pliago *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2008).

Los ensayos de virulencia realizados con los transformantes de *P. digitatum* (Figura 16) mostraron que los mutantes fluorescentes pueden ser una importante herramienta para estudios futuros del proceso de infección, ya que no mostraron diferencias de virulencia respecto de la cepa parental. En la mayoría de los ensayos de virulencia de transformantes de GFP de otros hongos se han obtenido resultados similares. En el hongo patógeno del maíz, *Cochliobolus heterostrophus*, las líneas transgénicas son tan virulentas como la cepa silvestre (Maor *et al.* 1998). Del mismo modo sucede con el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la enfermedad de Panamá en bananas, donde los transformantes no se diferenciaron marcadamente de la cepa silvestre en lo que se refiere a crecimiento y

características morfológicas (Visser *et al.* 2004). Además, los test de patogenicidad mostraron que el proceso de transformación no alteró la virulencia de los transformantes. Sin embargo, no todos los ejemplos en la bibliografía muestran los mismos resultados. En el hongo patógeno *Trichophyton mentagrophytes* la infección se mantuvo, aunque el grado de virulencia no fue el mismo entre todos los transformantes de GFP obtenidos, posiblemente por diferencias en el lugar de integración (Kaufman *et al.* 2004). Por este motivo, se hace necesario un ensayo previo de patogénesis de cada uno de los transformantes.

## **2. Implicación del factor de transcripción PacC de *P. digitatum* en patogenicidad**

En la interacción con el huésped, los hongos están expuestos a continuas variaciones en las características físico-químicas y biológicas del medio ambiente, entre las que se encuentran las variaciones de pH. Por lo tanto, muchos hongos han desarrollado sistemas para poder desenvolverse en un amplio intervalo de pH ambiental. En el caso de los hongos patógenos, el pH ambiental determina la capacidad del patógeno para colonizar e invadir con éxito un huésped específico, ya que la producción y secreción de diferentes factores de patogenicidad está en muchos casos regulada por el pH ambiental (Eshel *et al.* 2002; Prusky *et al.* 2001, 2003; Rollins, 2003; Yakoby *et al.* 2000). Uno de los posibles mecanismos comunes para lograr la colonización en un entorno de pH dinámico es la respuesta del patógeno a las condiciones de pH de cada huésped. En la interacción patógeno-huésped, el patógeno puede alterar el pH local para adaptarlo a su arsenal enzimático, de forma que el nivel de patogenicidad está relacionado con la eficacia para lograr el cambio de pH del tejido del huésped. En este sentido, a los hongos capaces de producir un ambiente alcalino se les denomina hongos alcalinizadores, y aquellos que producen un ambiente ácido se les denominan hongos acidificadores. En los ensayos realizados en esta Tesis con las tres principales especies de *Penicillium* patógenas de frutos (*P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*) se ha comprobado que la infección de frutos cítricos por *P. digitatum* y *P. italicum* está acompañada de una fuerte acidificación del tejido desde el primer día tras la inoculación, alcanzándose descensos de hasta dos unidades de pH (Figura 26). Cuando se inocula *P. expansum* el descenso que se produce es menor y más tardío, disminuyendo en una unidad de pH a los 4 dpi. Por lo tanto, podemos encuadrar a las especies de *Penicillium* dentro de los hongos acidificadores. Estos datos ya habían sido sugeridos por Prusky y colaboradores (2004). En otros patógenos fúngicos como *B. cinerea* (Prusky *et al.* 2003) y *S. sclerotiorum* (Bateman y Beer, 1965; Rollins y Dickman, 2001; Vautard-Mey y Fevre, 2003) se ha comprobado que también acidifican el tejido del huésped en su ataque. Estos fitopatógenos disminuyen el pH del huésped mediante la secreción de cantidades significativas de ácido oxálico (Manteau *et al.* 2003; Rollins y Dickman, 2001) mientras que los ácidos cítrico y glucónico son principalmente secretados por *Penicillium* (Prusky *et al.* 2003) y *Aspergillus* (Ruijter *et al.* 1999). Es de prever que la regulación de la expresión génica mediada por el pH ambiental pueda tener un importante papel en la capacidad de este patógeno para infectar frutos cítricos.

*A. nidulans* es un buen ejemplo en el que el sistema de regulación del pH está ampliamente caracterizado. El pH alcalino es percibido y transmitido mediante la vía de señalización PAL, la cual activa el factor de transcripción PacC (Peñalva y Arst, 2002). PacC es un activador

transcripcional de “genes alcalinos” y un represor transcripcional de “genes ácidos” (Tilburn *et al.* 1995). PacC y su vía de regulación está conservada en hongos, y se ha demostrado que este regulador participa en la virulencia de algunos hongos patógenos (Rollins, 2003; Caracuel *et al.* 2003; Miyara *et al.* 2008). Por este motivo se decidió estudiar el papel que juega el factor de transcripción PacC en el proceso de infección de *P. digitatum* sobre frutos cítricos.

A partir de la secuencia de un fragmento del gen *pacC* previamente disponible en el laboratorio se clonó el gen *pacC* de *P. digitatum* mediante rastreo de la genoteca de DNA genómico obtenida en esta Tesis. La comparación de la secuencia de la proteína deducida de PacC de *P. digitatum* con la de otros hongos filamentosos mostró una gran similitud (Figura 29). La región más conservada está localizada en la región de dedos de cinc, que es la región responsable de la interacción directa con el DNA y que además está involucrada en la localización nuclear de la proteína (Espeso *et al.* 1996, Mingot *et al.* 2001). Además, la posición del primer intrón en el gen *pacC* de *P. digitatum* se encuentra también muy conservada (Caracuel *et al.* 2003, Flaherty *et al.* 2003, Tilburn *et al.* 1995). En la secuencia del promotor se localizaron 3 sitios de unión de PacC, cuya secuencia consenso es 5'-GCCAAG-3', entre las posiciones -228 y -1122 pb aguas arriba del codón de inicio. Esto sugiere que la expresión de *pacC* se autoregula por sí misma. Mediante análisis Northern se comprobó que la expresión del gen *pacC* de *P. digitatum* en la cepa silvestre no mostró una expresión diferencial durante la infección (Figura 30). Este hecho era esperable, ya que durante la infección se produce una acidificación del medio y como ya se ha comentado anteriormente la transcripción de *pacC* se activa en condiciones alcalinas (Rollins *et al.* 2001; Caracuel *et al.* 2003).

Para profundizar en el estudio del posible papel que juega PacC en patogénesis, se abordó la obtención de mutantes de *P. digitatum* que produjesen constitutivamente una forma activa de la proteína, independientemente del pH ambiental, así como de mutantes que careciesen de dicho factor transcripcional. En los primeros debe tener lugar la activación constante de la transcripción de genes “alcalinos” y la represión constitutiva de los genes “ácidos”.

Se obtuvieron transformantes merodiploides de *P. digitatum* que además de la copia nativa del gen *pacC* expresan constitutivamente la forma activa de PacC. En los ensayos de patogenicidad sobre frutos cítricos se observó una reducción de la virulencia con respecto de la cepa silvestre de un 20 % (Figura 35). Como hemos comentado anteriormente, en el punto donde se inicia la infección de *P. digitatum* en frutos de naranja se produce una acidificación del medio. Conjuntamente, estos resultados sugieren que PacC es un regulador negativo de la patogenicidad de *P. digitatum*, pero de efecto muy moderado, ya que apenas hay disminución de la capacidad infectiva. El conjunto de genes y los procesos regulados por este factor de transcripción en *P. digitatum* es todavía desconocido, aunque en muchos hongos fitopatógenos se ha demostrado que muchas enzimas de degradación de la pared celular, así como varias proteasas, están reguladas coordinadamente por el pH ambiental (Peñalva y Arst, 2004). Los resultados obtenidos con los mutantes de *P. digitatum* que producen constitutivamente una forma activa de la proteína PacC confirman los resultados obtenidos previamente en otros hongos. Así, en *Fusarium oxysporum* los mutantes nulos en *pacC*

presentan una ligera mayor capacidad de infección en plantas de tomate que la cepa silvestre, mientras que plantas inoculadas con un mutante dominante *pacC<sup>c</sup>*, equivalente a los mutantes de *pacC* obtenidos en este trabajo, mostraron un retraso en el desarrollo de la infección (Caracuel *et al.* 2003). Sin embargo, en otros hongos, PacC ejerce de regulador positivo de la patogenicidad. Por ejemplo, mutantes nulos de *S. sclerotiorum* en *pac1*, el gen homólogo de *pacC* en *A. nidulans*, presentan una reducción drástica de virulencia respecto de la cepa silvestre en ensayos de infección frente a tomate y *Arabidopsis*, confirmando la importancia de ese factor transcripcional en patogénesis (Rollins, 2003). En *Colletotrichum acutatum*, hongo patógeno de cítricos como *P. digitatum*, la disrupción del gen *PacC<sup>KLAP2</sup>* originó mutantes que eran hipersensibles a pH alcalino. Estos mutantes vieron alterada su capacidad para la producción y generación del apresorio y por lo tanto se redujo su virulencia (You *et al.* 2007).

A pesar de haber analizado aproximadamente 800 transformantes de *P. digitatum* para identificar mutantes nulos que carezcan del gen *pacC*, no se ha obtenido ninguno. La primera construcción empleada para la obtención de dichos mutantes contenía una kilobase de la secuencia del promotor y del terminador de *pacC* flanqueando el casete de resistencia a higromicina para que, mediante recombinación homóloga, se integrase en el genoma introduciendo una copia del gen de resistencia a higromicina B en lugar del gen *pacC*. Tras el análisis de más de 500 transformantes resistentes a higromicina B, en ninguno de ellos se había producido recombinación homóloga en locus del gen *pacC*. Por este motivo nos planteamos dos alternativas con la finalidad de aumentar la frecuencia de recombinación homóloga. En la primera de ellas se preparó una nueva construcción plasmídica que contenía 1,5 kb de las regiones del promotor y del terminador flanqueando al gen de resistencia a higromicina, en lugar de 1 kb como se había empleado anteriormente. En la segunda aproximación, que se ha desarrollado más en profundidad en el apartado 1.4 de Resultados, se pretendió obtener una cepa mutante de *P. digitatum* que careciese del gen *ku80* y fuese defectuosa en el mecanismo de recombinación no homóloga o de unión de extremos no homólogos (NHEJ).

De la primera de las nuevas aproximaciones, en las que se alargó la secuencia de las regiones adyacentes al gen de resistencia de higromicina, se analizaron más de 300 nuevos transformantes. Como en el caso anterior, aunque todos tenían el gen de resistencia a higromicina B, ninguno de ellos presentaba la sustitución del gen *pacC* por la construcción contenida en el T-DNA.

Como no se ha obtenido todo el conjunto de mutantes posibles de *pacC*, sólo se puede especular con los resultados de los mutantes obtenidos. Según estos resultados, PacC sería un regulador negativo de la virulencia en *P. digitatum*. En los mutantes *PacC<sup>c</sup>*, de producción constitutiva de la forma activa de este factor de transcripción, se deben reprimir los genes "ácidos", entre los que se deben encontrar genes de patogenicidad/virulencia, conduciendo a un fenotipo de disminución más o menos drástica de la capacidad infectiva. En teoría si se hubiese obtenido el mutante deletante éste debería ser más virulento que la cepa silvestre, aunque sería difícil de comprobarlo debido a que la cepa silvestre de *P. digitatum* ya es de por sí muy virulenta.

### **3. Nuevas alternativas para la obtención de mutantes con expresión reducida de genes diana**

La gran dificultad encontrada para la obtención de mutantes de delección de *pacC* sugiere una dificultad intrínseca en el proceso de recombinación homóloga en el hongo filamentoso *P. digitatum*. Ante esta situación nos planteamos desarrollar nuevas herramientas que permitiesen abordar en el futuro el silenciamiento génico: obtener mutantes nulos  $\Delta ku80$  y construir vectores para RNAi.

#### **3.1 Obtención de mutantes nulos *ku80* ( $\Delta ku80$ )**

Como se ha comentado anteriormente, una de las posibles causas de la no obtención de mutantes de delección del gen *pacC*, es que la frecuencia de recombinación homóloga en *P. digitatum* sea muy baja. En eucariotas se han identificado dos mecanismos por los que el DNA puede integrarse en el genoma. La recombinación homóloga (RH), que resulta en la integración en el locus diana, y la recombinación no homóloga (NHEJ), que resulta en una integración aleatoria en el genoma. Mientras que la RH se produce fácilmente en *S. cerevisiae*, la vía NHEJ es el modo dominante en la mayoría de los hongos. El principal componente del sistema NHEJ es el complejo DNA-PK que consiste en tres proteínas, la unidad catalítica DNA-PK y el dímero Ku70/Ku80.

En *Kluyveromyces lactis* se demostró un incremento significativo de la frecuencia de RH gracias a la delección de los genes *ku70* o *ku80* (Kooistra *et al.* 2004). Este concepto ha sido transferido a otros hongos, incluyendo *Neurospora crassa* (Ninomiya *et al.* 2004; Ishibashi *et al.* 2006), *Claviceps purpurea* (Haarmann *et al.* 2008) y algunos Aspergilli (*A. nidulans* (Nayak *et al.* 2006), *A. fumigatus* (Krappmann *et al.* 2006), *A. soyae* (Takahashi *et al.* 2006), *A. niger* (Meyer *et al.* 2007) y *A. parasiticus* (Chang, 2008). En todos estos hongos la delección de los genes homólogos a *ku70* y *ku80* ha resultado en un aumento significativo en la eficacia de la RH.

Por esta razón decidimos obtener un mutante nulo  $\Delta ku80$  de *P. digitatum*. Partiendo de la genoteca PD1G y usando oligonucleótidos degenerados basados en la secuencia de los genes ortólogos de *ku80* de otros hongos filamentosos, se clonó el gen *ku80* de *P. digitatum*. Se determinó la secuencia del gen, incluyendo más de 1,5 kb tanto de promotor como de terminador, y se obtuvieron construcciones que contenían más de 1,5 kb de promotor y terminador flanqueando el casete de resistencia a higromicina. De 30 transformantes analizados, siete carecían del gen *ku80* original, lo que supone una frecuencia de RH del 23,3%. Este aumento de la frecuencia con respecto al 0 % que se obtuvo con los transformantes de *pacC* se debió únicamente al aumento de la longitud de las secuencias flanqueantes de 1 a 1,5 kb. Esto sugiere la importancia de la longitud de las secuencias flanqueantes del gen diana en las construcciones para que se produzca correctamente la recombinación homóloga. En otros hongos, como por ejemplo *A. niger* y *A. nidulans*, 500 pb fueron suficientes para obtener unas altas frecuencias de recombinación (Nayak *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2007), mientras que en *N. crassa* y *A. fumigatus* se necesitó al menos una longitud mínima de 1 kb (Krappmann *et al.* 2006; Ishibashi *et al.* 2006). En la Tabla 18 se



muestra como a mayor longitud de las secuencias flanqueantes se obtiene una mayor frecuencia de recombinación homóloga.

En los ensayos de infección sobre frutos de naranja, los mutantes  $\Delta ku80$  no mostraron diferencias en patogenicidad respecto a la cepa silvestre (Figura 23). Además, tanto el crecimiento como las características morfológicas de los mutantes cultivados en medio no selectivo tampoco difirieron de la cepa silvestre (Figura 22). Por lo tanto, estos resultados sugieren que estos mutantes  $\Delta ku80$  pueden ser empleados para la delección de otros genes y de este modo aumentar el porcentaje de recombinación homóloga, lo que permitiría reducir tiempo y esfuerzo a la hora de obtener mutantes nulos de otros genes. Estas ventajas hacen de los mutantes  $\Delta ku80$  una nueva plataforma experimental para el análisis funcional de gran cantidad de genes de *P. digitatum*. Todas las construcciones que hemos empleado en este trabajo tienen como base el mismo vector binario, que posee como marcador de resistencia el gen *hph* (resistencia a higromicina B). Para poder transformar la cepa  $\Delta ku80$ , que ya es resistente a higromicina, es necesario disponer de un nuevo marcador de resistencia. De entre los marcadores más utilizados en hongos filamentosos se seleccionó la fleomicina, ya que ha sido utilizada con éxito en otros hongos próximos, como por ejemplo *P. chrysogenum* (Snoek *et al.* 2009), también para la eliminación de los genes *ku70/ku80*. Se comprobó la no resistencia de la cepa silvestre y sobre el vector original se obtuvo un nuevo vector con el gen de resistencia a fleomicina como marcador de selección para los transformantes. Sin embargo, contrariamente al caso de la higromicina, la frecuencia de transformantes fue muy baja y se obtuvieron bastantes mutantes espontáneos resistentes al antibiótico. Además, los pocos transformantes obtenidos eran incapaces de esporular en medio con el antibiótico, aunque esta capacidad se recuperaba al pasarlos a medio sin el mismo. Por lo tanto, aunque la fleomicina puede ser un potencial segundo marcador de resistencia para *P. digitatum*, aún debe profundizarse en la mejora de este sistema

**Tabla 18.** Ejemplos de la frecuencia de la eliminación de genes diana obtenidas en cepas silvestres y líneas  $\Delta ku70$  de varios hongos filamentosos (Meyer, 2008)

Cepa	Longitud secuencias homólogas flanqueantes (pb)			Referencia
	100	500	1000	
<i>A. fumigatus</i>	wt: 0% mut: 75%	wt: 2% mut: 84%	wt: 10% mut: 96%	Krappmann <i>et al.</i> 2006
<i>A. nidulans</i>	wt: n.d. mut: n.d.	wt: n.d. mut: 89%	wt: n.d. mut: 92%	Nayak <i>et al.</i> 2006
<i>A. niger</i>	wt: 4% mut: 18%	wt: 7% mut: 88%	wt: 19% mut: 95%	Meyer <i>et al.</i> 2007
<i>A. sojae</i>	wt: n.d. mut: 0%	wt: n.d. mut: 14%	wt: n.d. mut: 71%	Takahashi <i>et al.</i> 2006
<i>N. crassa</i>	wt: 2% mut: 10%	wt: 9% mut: 91%	wt: 21% mut: 100%	Ninomiya <i>et al.</i> 2004
<i>S. macrospora</i>	wt: n.d. mut: n.d.	wt: n.d. mut: n.d.	wt: 4% mut: 100%	Pöggeler y Kück, 2006

wt: cepa silvestre; mut: línea mutante deletante del homólogo *Ku70*; n.d.: no determinado.

### **3.2 RNA interferente (RNAi)**

Para solucionar los problemas de la baja frecuencia de RH obtenida con los transformantes de *pacC* se siguieron dos vías diferentes. Una de ellas fue la anteriormente expuesta, la obtención de mutantes de delección  $\Delta ku80$ , y la segunda alternativa fue la construcción de vectores para el silenciamiento génico por RNA interferente. En la última década esta aproximación ha experimentado un gran desarrollo en diferentes organismos eucariotas (Napoli *et al.* 1990; Romano y Macino, 1992), siendo una alternativa para analizar la función de aquellos genes en los que es difícil la obtención de mutantes nulos mediante interrupción génica.

El uso del silenciamiento genético basado en RNAi resulta especialmente atractivo cuando los genes diana están presentes en copia múltiple o cuando la eliminación de los genes diana es letal. También es útil en muchos sistemas de hongos, como el caso de *P. digitatum*, en el que la frecuencia de recombinación homóloga es baja, ya que esto dificulta la obtención de mutantes nulos (Nakayashiki 2005; Nakayashiki y Nguyen 2008).

Se diseñaron dos vectores para el silenciamiento génico, cada uno con un marcador de selección diferente: uno con el gen de resistencia a higromicina y otro a fleomicina. El desarrollo de esta herramienta es una importante aproximación que podrá ser utilizada para el estudio de genes involucrados en la virulencia de *P. digitatum* como ya ha sido utilizada con éxito en varios hongos fitopatógenos. Por ejemplo, en *M. oryzae* ha sido utilizada para el silenciamiento de un gen que codifica una poliketido sintasa (*MPG1*) y resultó en el silenciamiento del 70-90 % de los transformantes obtenidos. Sin embargo, el silenciamiento no fue homogéneo entre todos los transformantes. El silenciamiento de este gen que codifica una hidrofobina fúngica involucrada en las interacciones superficiales durante la infección, relacionadas con el desarrollo del hongo, resultó en una severa reducción de la virulencia (Nakayashiki *et al.* 2005).

## **4. Aplicación de herramientas genómicas en el estudio de la interacción *P. digitatum*- fruto cítrico.**

### **4.1 Identificación de genes de *P. digitatum* que se inducen durante la infección de frutos cítricos**

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha construido una genoteca substractiva de cDNA, que se denominó PDS, para obtener fragmentos de genes de *P. digitatum* que se inducen durante la infección de frutos de naranja. Esta genoteca se obtuvo mediante la técnica de SSH. Esta técnica permite identificar genes que se expresan diferencialmente entre dos poblaciones combinando un proceso de normalización y sustracción en un proceso único (Gurskaya *et al.* 1996). El paso de normalización equilibra la abundancia de fragmentos de DNA dentro de la población diana, y el paso de sustracción excluye secuencias que son comunes a las poblaciones que se comparan. Esto aumenta drásticamente la probabilidad de obtener fragmentos de cDNA expresados diferencialmente que son menos abundantes y además simplifica el análisis de la genoteca (Rebrikov *et al.* 2004). Una de las principales ventajas que aporta esta técnica sobre otras, como por ejemplo, la hibridación DNA-DNA

usando micromatrices, es que esta última técnica identifica sólo los genes que están presentes en la matriz y no los que están ausentes; mientras que el SSH no requiere de ningún conocimiento genómico previo del organismo en estudio. Por lo tanto, se seleccionó el SSH como la mejor alternativa ya que no se necesita un conocimiento previo del sistema. Además, esta técnica elimina cualquier paso intermedio para la separación física del cDNA de cadena simple y doble hebra y mediante hibridación sustractiva puede lograr alcanzar un enriquecimiento en cDNAs expresados diferencialmente en más de 1000 veces. Este método ya ha sido aplicado para el estudio de la interacción planta-patógeno, resultando en la identificación de genes que se sobreexpresan durante la interacción (Thara *et al.* 2003; Li *et al.* 2004). En la misma línea se utilizó una segunda aproximación genómica que fue la creación de una macromatriz partiendo de los clones obtenidos previamente en la genoteca. De forma similar a las micromatrices, las membranas de nylon conteniendo fragmentos de cDNAs se han utilizado para comparar los patrones de expresión génica de miles de genes en una sola hibridación (Rast *et al.* 2000). Esta tecnología de hibridación de macromatrices proporciona un método rápido y de alto rendimiento para el cribado de una genoteca de cDNA obtenida mediante SSH.

Se han empleado estas dos aproximaciones genómicas para la identificación de genes de *P. digitatum* que se inducen durante la infección. Para esta finalidad se compararon dos muestras: una obtenida a partir de tejido de naranja infectada por *P. digitatum* a las 72 horas tras la inoculación, cuando la maceración del tejido es ya evidente y más del 90 % del RNA ribosómico presente en el tejido corresponde al hongo. La segunda muestra empleada como control para la sustracción fue una mezcla de RNAs de tejido de fruto no infectado y de hongo crecido *in vitro*. Para comprobar la eficiencia de la sustracción y que la población de cDNAs obtenida realmente estaba enriquecida en genes diferenciales, se comparó la amplificación por PCR de dos genes entre una muestra de cDNA sustraída y una no sustraída (Figura 38). Previamente se había comprobado mediante hibridación Northern que los genes tenían expresión constitutiva (Figura 37).

Tras secuenciar y analizar 295 clones se obtuvo un valor de redundancia de la genoteca del 49 %, lo que sugiere que el proceso de sustracción se llevó a cabo correctamente, ya que indica que a pesar de no tener muchas secuencias el 49 % de las mismas están repetidas, por lo que la genoteca está enriquecida en un grupo relativamente pequeño de genes (Tabla 12). De los 1440 clones seleccionados al azar para preparar la macromatriz, el 51,5 % presentaban una mayor expresión en infección, una muestra más de que la genoteca PDS está enriquecida en genes que se inducen durante el proceso de infección. A partir de los resultados de hibridación se secuenciaron 76 clones cuyo nivel de inducción era igual o superior a 2 y que no habían sido ya obtenidos en la secuenciación aleatoria. Sin embargo, debido al alto porcentaje de redundancia obtenido en la genoteca PDS, de esta segunda ronda de secuenciación se obtuvieron muy pocos genes nuevos. Entre los genes nuevos que se identificaron en la macromatriz se encuentran genes que codifican una proteína TorA (PDIP\_64280), una proteína ribosomal 40S (PDIP\_74880), una proteína de choque térmico (PDPI\_26120), una proteína hipotética (PDIP\_61480) y un gen con homología a proteínas del fruto (fragmento entre Cs7g25660 y Cs7g25670).

La síntesis de las proteínas de choque térmico se ha asociado a la respuesta tanto al estrés térmico como al estrés oxidativo (Thompson *et al.* 2008; Albrencht *et al.* 2010) como un mecanismo de tolerancia contra condiciones de crecimiento adverso, estabilizando el metabolismo celular y previniendo la acumulación de proteínas desnaturalizadas. Sin embargo, poco se conoce de las funciones de las quinasas TOR (del inglés Target Of Rapamycin) en hongos filamentosos. La actividad antifúngica de la rapamicina contra hongos como *Cryptococcus neoformans*, *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* y *Penicillium sp.* (Cruz *et al.* 1999; Muthuvijaban y Nmarten, 2004; Wong *et al.* 1998) sugiere que la función de las TOR en los hongos filamentosos es similar a las de *S. cerevisiae* y humanos. En éstos, TorA es una proteína que integra señales para el control del crecimiento de la célula, especialmente en respuesta a la disponibilidad de nutrientes a través de la biogénesis de ribosomas, y regulación transcripcional y traduccional (Cutler *et al.* 1999).

En la secuenciación de los clones seleccionados de la macromatriz, más del 50 % de las secuencias obtenidas pertenecen a cinco unigenes (Tabla 14), tres corresponden a proteasas (PDIP\_82060, PDIP\_12220 y PDIP\_06020), una a una poligalacturonasa (PDIP\_64460), y la última corresponde a una Proteína C inducida por concanamicina (CipC) (PDIP\_45260). Estos 5 genes se encuentran entre los 13 agrupamientos con mayor número de ESTs obtenidos en la genoteca PDS. Los resultados de hibridación de la macromatriz aportan información sobre el nivel de expresión de cada uno de los genes y por lo tanto, complementan los obtenidos con la secuenciación aleatoria de clones de la genoteca. De hecho, sólo 8 de los 24 unigenes con mayor valor de inducción corresponden a los más abundantes obtenidos en el SSH (Tabla 13). Además, en este trabajo se empleó también en análisis Northern que nos permitió confirmar la expresión diferencial de los genes obtenidos así como revelar su patrón de expresión.

Para tener una visión global de los procesos biológicos y de las funciones moleculares más sobrerrepresentadas en la infección de *P. digitatum* sobre frutos cítricos, se estudió la distribución en ontologías génicas de los 94 genes de *P. digitatum* identificados en la genoteca PDS que tienen anotación GO (Figuras 40 y 41). Atendiendo al proceso biológico, la mayoría de las categorías están relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y proteínas, la biosíntesis de moléculas y la obtención de energía por la célula, sugiriendo que todos los procesos relacionados con el metabolismo primario están sobreexpresados. La única categoría clásicamente relacionada con la patogénesis que encontramos es la de proteólisis. Este resultado concuerda con la abundancia de ESTs correspondientes a proteasas que se obtuvo en la secuenciación de clones de la genoteca, lo que apunta a que este conjunto de proteínas juega un papel relevante en la patogenicidad de *P. digitatum*.

En la clasificación por función molecular (Figura 41) encontramos muy representadas aquellas categorías que parecen consistentes con los requerimientos de un estilo de vida patogénico. Entre estas categorías aparecen no sólo la actividad peptidasa sino también dos actividades hidrolasas. Estos resultados, paralelamente a los obtenidos previamente, sugieren que la patogénesis del hongo está asociada con el incremento del potencial catalítico de enzimas tales como hidrolasas y peptidasas. Sin embargo, la categoría de función molecular más representada está relacionada con la unión a iones metálicos y su

transporte. Se sabe que los organismos vivos necesitan iones metálicos para sus procesos metabólicos. En el caso de los hongos, metales como el Fe, Co, Mg, Mn, etc. actúan como cofactores de distintas enzimas que intervienen tanto en diversas rutas metabólicas como en proteínas reguladoras (Kozlovskii *et al.* 2000). La abundancia de proteínas relacionadas con iones metálicos sugiere la importancia de los mismos no sólo para el crecimiento normal del hongo, sino con el proceso de infección.

La combinación de técnicas como el SSH y la hibridación de macromatrices junto con el análisis de anotación funcional de las secuencias por ontologías génicas, ha permitido la identificación de varios unigenes, que presentan diferencias significativas en los niveles de expresión entre el tejido de estudio y el control, y por lo tanto presentan una expresión diferencial durante la infección. Para un estudio en mayor profundidad estos genes se han agrupado según la función que desempeñan.

#### **4.2 Respuesta a estrés y detoxificación**

En la genoteca PDS se han identificado varios genes relacionados con actividad oxidoreductasa y procesos metabólicos de especies reactivas de oxígeno (ROS). Es conocido que en la interacción planta-patógeno se produce una producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Mehdy 1994) que están destinadas a la defensa del huésped. Aunque hay algún caso como el del hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* en el que existe cierta controversia en este tema. En la interacción *B. cinerea-Nicotiana benthamiana*, las ROS tienen un efecto positivo en la expansión de las lesiones (Asai y Yoshioka, 2009). Sin embargo, en la interacción *B. cinerea-Solanum lycopersicum* la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la pared celular bloquea efectivamente el desarrollo temprano de *B. cinerea* (Asselbergh *et al.* 2007). En muchos casos, la respuesta inicial de la planta al patógeno involucra la producción de peróxido de hidrógeno. En la genoteca PDS se ha identificado un grupo de cDNAs que codifican enzimas que están relacionadas con el metabolismo ROS como son una superóxido dismutasa (PDIP\_66470), una tioredoxina (PDIP\_60580), una glutatión-S-transferasa (PDIP\_62390), una NADH:ubiquinona oxidoreductasa (PDIP\_19750), una amino oxidasa de cobre (PDIP\_13870), una sarcosina oxidasa (PDIP\_07830) y una proteína Rieske (PDIP\_10140).

La superóxido dismutasa (SOD) es una proteína que pertenece a la familia de enzimas que neutralizan el efecto de las ROS. La SOD cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. En varios hongos fitopatógenos se han identificado diversas SODs y se ha estudiado el papel de las mismas en la virulencia. Por ejemplo, en *B. cinerea* se ha estudiado la expresión de gen *Bcsod1* tanto *in vitro* como *in planta* y mutantes deletantes del gen mostraron una clara reducción de la virulencia (Rolke *et al.* 2004), posiblemente porque son incapaces de hacer frente a la defensa del huésped como lo hace la cepa silvestre, lo que implica su importancia en la virulencia y de ahí su mayor expresión en el proceso de infección. Veluchamy y colaboradores (2011) identificaron un gen que codifica una SOD en *S. sclerotiorum*, *Sssod1*. Los mutantes a los que se les eliminó este gen mostraron una reducción de la virulencia en la infección de plantas de tomate y de tabaco en relación a la cepa silvestre.

Las tioredoxinas reducen otras proteínas mediante intercambio de puentes disulfuro y participan activamente en la respuesta de la célula a ROS (Collet y Messens, 2010). La eliminación del gen *trxA* en *A. nidulans* afectó al desarrollo y a la resistencia del hongo frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Thön *et al.* 2007). El papel de las ROS en la interacción cítrico-*P. digitatum* ha sido poco estudiado, aunque la supresión de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en frutos cítricos puede ser uno de los mecanismos de patogenicidad de *P. digitatum* (Macarisin *et al.* 2007; Droby *et al.* 2008; Torres *et al.* 2011).

PDIP\_62390 codifica una Glutación-S-transferasa (GST), enzima que detoxifica compuestos tóxicos tales como los peróxidos de ácidos grasos, mediante la conjugación con glutatión. La GST es importante para proteger las células del estrés oxidativo (Marrs, 1996; Hayes *et al.* 2005). Esta enzima ha sido poco estudiado en hongos. En levadura, las GSTs están implicadas en la protección de las células contra el daño causado por el estrés oxidativo, metales pesados y compuestos antifúngicos (Veal *et al.* 2002). La importancia de esta enzima en la defensa frente a las ROS y la protección de las proteínas celulares frente al estrés oxidativo quedó puesta de manifiesto en los estudios realizados por Qin y colaboradores (2007) con *P. expansum*. Estos autores observaron que la supresión de la expresión de estas proteínas resultó en un aumento de la cantidad de ROS y un aumento del nivel de proteínas carboniladas en la célula. Prins y colaboradores (2000) clonaron un gen de *B. cinerea*, denominado *Bcgst1*, que codifica una GST. A pesar de que esta proteína puede permitir al hongo tolerar los componentes fungitóxicos producidos por la defensa de la planta, este gen no es esencial para la virulencia, ya que mutantes nulos carentes del mismo presentaron la misma virulencia que la cepa parental en ensayos de infección con hojas de tomate. Los datos obtenidos en otros hongos fitopatógenos junto con la expresión diferencial que se observa en el análisis Northern de estos tres genes (Figura 42) sugieren que son importantes para el proceso de infección detoxificando ROS.

Varias ESTs de la genoteca PDS corresponden a PDIP\_10140, una proteína en la que se localizó un dominio Rieske [2Fe-2S]. Este dominio es típico de proteínas que forman parte del complejo III (también conocido como ubiquinol citocromo-c-reductasa o complejo bc1) en la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria (Link, 1997). La importancia de este complejo radica en que se ha demostrado que contribuye a la producción de ROS inducida por hipoxia en levaduras (Guzy *et al.* 2007). Por este motivo se incluyó este gen dentro de la categoría de respuesta a estrés y detoxificación. Una vez obtenida la secuencia completa del gen se analizaron los dominios de la proteína y se comprobó que las proteínas con las que presentaba mayor similitud eran proteínas Rieske del tipo oxigenasas hidroxilantes de anillos aromáticos que contienen hierro distintos del grupo hemo ("Rieske-type non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases", RHO) y no proteínas del complejo III de la cadena respiratoria. El análisis BlastP de la proteína deducida de la secuencia mostró una alta identidad con varias proteínas de esta familia entre las que destacan una naftaleno 1,2-dioxigenasa y una colina monooxigenasa. Homólogos a esta proteína se encuentran en muchos hongos filamentosos, incluyendo fitopatógenos, pero en ningún caso se ha caracterizado esta proteína a partir de alguno de ellos.

El análisis de los dominios de la proteína RIS1 de *P. digitatum* en la base de datos Pfam reveló que, aparte del dominio Rieske [2Fe-2S], la proteína presenta un dominio catalítico “aromatic ring-hydroxylating dioxygenases” presente en tres tipos diferentes de dioxigenasas (fenilpropionato dioxigenasa, antranilato 1,2-dioxigenasa y benzoato 1,2-dioxigenasa). Estos datos sugieren que la proteína RIS1 de *P. digitatum* es del tipo dioxigenasa. La escisión de anillos aromáticos es una de las funciones más importantes de las dioxigenasas, que juegan papeles clave en la degradación de compuestos aromáticos (Chandrakant y Shwetha, 2011).

Los compuestos aromáticos como el benzoato y antranilato pertenecen a la segunda clase de sustratos orgánicos más abundantes utilizados para el crecimiento, junto a los carbohidratos, que la naturaleza proporciona tanto a bacterias como hongos como materia prima. Tanto el benzoato como el antranilato son convertidos en catecol por la benzoato 1,2-dioxigenasa y la antranilato 1,2-dioxigenasa, respectivamente. Bugos y colaboradores (1988) observaron que la degradación de compuestos aromáticos era importante durante el proceso de degradación de la madera por el hongo de la pudrición blanda *Lecytophora hoffmannii*. Estos procesos han sido poco estudiados en hongos, sin embargo se conoce que todas las vías de degradación de antranilato en bacterias compromete el ataque de una dioxigenasa para convertir el antranilato en catecol (Chang *et al.* 2003) y pueden ser utilizados como única fuente de carbono y energía. Por ejemplo *Pseudomonas putida* es capaz de degradar la limonina a través de una dioxigenasa (naftaleno 1,2-dioxigenasa) como única fuente de carbono y energía (Ghosh *et al.* 2006). La limonina es un limonoide presente en frutos cítricos, miembro de la clase de compuestos conocidos como furanolactonas. La fenilpropionato dioxigenasa degrada el 3-fenilpropionato que es un fenilpropanoide. Estos compuestos se encuentran ampliamente disponibles en el medio ambiente y pueden ser originados como productos de descomposición de varios constituyentes de plantas, tales como lignina, varios aceites o resinas (Turlin, 2001).

La expresión diferencial del gen *ris1* durante el proceso de infección de frutos de naranja en el hongo (Figura 42) sugiere que la proteína Rieske pertenece a la familia de las dioxigenasas y que su posible función estaría relacionada con la degradación de algún tipo de compuesto aromático producido por el fruto, como una fuente de carbono y energía para el crecimiento del hongo, como se ha descrito en otros hongos (Prenafeta-Boldú *et al.* 2006). A pesar de que el gen *ris1* presentó un marcado patrón de expresión diferencial, el fenotipo de los mutantes de delección no presentó diferencias respecto a la cepa silvestre (Figura 61) y tampoco se vio alterada la capacidad de infección (Figura 65). Esto sugiere que ninguna de las posibles funciones de la proteína codificada por este gen es fundamental para la patogenicidad del hongo y que es necesario un estudio fenotípico en profundidad para conocer la función de esta proteína.

Otras enzimas que están implicadas en el metabolismo ROS y que han sido identificadas en la genoteca PDS son una NADH:ubiquinona oxidoreductasa (PDIP\_19750), una amino oxidasa dependiente de cobre (PDIP\_13870) y una sarcosina oxidasa (PDIP\_07830). Aunque una revisión de la bibliografía sugiere que pueden estar relacionadas con la obtención de fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento del hongo, estas enzimas catalizan procesos en los que se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La NADH:ubiquinona reductasa, forma parte del complejo

respiratorio I, que es el punto de entrada de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Su expresión diferencial durante la infección puede sugerir que el hongo puede necesitar aumentar su actividad mitocondrial, posiblemente para proveerse de energía para el crecimiento. Aunque no se han realizado estudios en los que este gen haya sido caracterizado, sí que se ha obtenido evidencias de su implicación en el proceso de infección. En *F. graminearum* se utilizó la aproximación de integración mediante enzimas de restricción (restriction enzyme-mediated integration, REMI) para la obtención de mutantes deletantes aleatorios. En uno de estos mutantes el vector fue integrado en una NADH:ubiquinona reductasa. Estos mutantes presentaron un crecimiento similar a la cepa silvestre aunque vieron reducida su virulencia (Seong *et al.* 2005). Goswami y colaboradores (2006) también encontraron este gen cuando crearon una biblioteca de cDNA mediante SSH con la finalidad de conocer la expresión de genes relacionados con las fases iniciales de la patogénesis de *F. graminearum* sobre trigo.

Las amino oxidasas dependientes de cobre son metaloenzimas que catalizan la desaminación oxidativa de varios sustratos amino a sus correspondientes aldehídos produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brazeau *et al.* 2004). En procariontes y hongos, las amino oxidasas permiten a los organismos la utilización de aminas como una fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento celular (Samuels *et al.* 2005). Sin embargo, mientras que no existen estudios sobre el papel durante el proceso de infección de los hongos, en las plantas se sabe que generan especies reactivas de oxígeno y están involucradas en la respuesta de defensa frente a patógenos y en la inducción del crecimiento (Cona *et al.* 2006). Este gen no tuvo una diferencia de expresión significativa en infección según los datos de expresión obtenidos en la hibridación de la macromatriz. Por lo tanto, estos datos sugieren que su función no es esencial para el proceso de infección. Probablemente sus niveles de expresión sean parecidos en las dos condiciones estudiadas y su función principal estaría más encaminada a la obtención de energía para el crecimiento. Sin embargo, en el caso contrario se encuentra la sarcosina oxidasa (PDIP\_07830). El nivel de inducción de este gen durante la infección respecto al crecimiento en condiciones *in vitro* es significativo. La sarcosina oxidasa es una enzima que cataliza la desmetilación oxidativa de la sarcosina originando formaldehído, glicina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wyss y Kaddurah-Daouk, 2000). Esta enzima es inducida en varios microorganismos del suelo cuando crecen con sarcosina como fuente de carbono y energía (Kvalnes-Krick y Jorns, 1991) hecho que coincide con la inducción de la expresión del gen en la macromatriz. Sin embargo, el papel fisiológico de la sarcosina oxidasa es desconocido y no ha sido caracterizada en ningún hongo. Los pocos datos de que se dispone podrían sugerir que esta enzima se induce con la presencia de algún sustrato del fruto por determinar y sería usado como fuente de carbono y energía. Produciendo secundariamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reacción.

La producción de especies reactivas de oxígeno, tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, fueron los primeros eventos que se correlacionaron con la resistencia de plantas a los patógenos (Baker y Orlandi, 1995), además de estar involucrados en el desarrollo de resistencia en varios tipos de frutos (Torres *et al.* 2003; Cao y Jiang, 2006; Zeng *et al.* 2006) incluyendo las naranjas (Torres *et al.* 2011). En naranjas inoculadas con *P. digitatum* la producción de especies reactivas de oxígeno parece estar suprimida, mientras que la inoculación con una especie cercana no patógena, como es *P. expansum*, desencadena la producción de ROS en los sitios



donde tiene lugar la inoculación (Macarisin *et al.* 2007). Además, en frutos cítricos infectados por *P. digitatum* la actividad de diferentes enzimas antioxidantes, involucradas en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, decrecen a medida que el patógeno progresa a través del tejido (Ballester *et al.* 2006). Los datos obtenidos en esta Tesis concuerdan parcialmente con lo que se conoce hasta el momento sobre la interacción *P. digitatum*-frutos cítricos, en la que se sugiere que *P. digitatum* suprime la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se produce en los tejidos del fruto como respuesta al proceso de infección. La expresión diferencial de enzimas como SOD o GST, cuya función es neutralizar el efecto de las especies reactivas de oxígeno y ayudar a hacer frente al estrés oxidativo señala en esa dirección. Sin embargo, otros genes de la genoteca PDS, como los que codifican una amino oxidasa dependiente de cobre y una sarcosina oxidasa, implican una producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que según los datos de Macarisini *et al.* (2007) no se detecta en el tejido infectado. Podría sugerirse que, según las evidencias encontradas, el mecanismo de acción de *P. digitatum* durante la infección de frutos cítricos sería semejante al expuesto por Kim y colaboradores (2008) para el hongo necrótrofo *S. sclerotiorum*. En este modelo el hongo suprime la producción de ROS en la planta en condiciones de pH ácido, que se alcanzan mediante la producción de ácido oxálico por parte del hongo. A su vez el hongo produce ROS para promover la compatibilidad. Este comportamiento dual, suprimiendo y produciendo ROS, se explicaría asumiendo diferencias temporales entre ambos procesos. En el caso de la interacción entre los frutos cítricos y *P. digitatum* se encuentran algunas analogías: hay una fuerte reducción del pH, aunque probablemente debido a la acumulación de ácido glucónico o ácido galacturónico en vez de ácido oxálico y una supresión de la producción de ROS. Sin embargo, aún no hay ninguna evidencia determinante que indique la relevancia de estos dos factores en la patogenicidad de *P. digitatum*.

#### **4.3 Enzimas relacionadas con la pared celular**

La primera barrera encontrada por un hongo fitopatógeno durante la infección es la cutícula del huésped y la pared celular vegetal primaria. El éxito de la infección depende no sólo de la capacidad del patógeno para penetrar y colonizar los tejidos del huésped, sino también de su capacidad para degradar los polímeros de la pared celular en los nutrientes requeridos para su desarrollo. Por lo tanto, la degradación enzimática de los polímeros extracelulares se considera clásicamente un aspecto importante de las infecciones fúngicas de las plantas. Los hongos fitopatógenos secretan una amplia gama de enzimas de degradación de la pared que actúan en diferentes etapas de la infección (Annis y Goodwin, 1997; Ten Have *et al.* 2002). Entre este tipo de enzimas se encuentran las pectinasas, celulasas y xilanasas que están implicadas en la degradación de polisacáridos (St Leger *et al.* 1999; Olivieri *et al.* 2004; Jayani *et al.* 2005; Brito *et al.* 2006).

El segundo grupo de unigenes más abundantes de la biblioteca PDS comprende genes que codifican enzimas relacionadas con la pared celular, entre las que destacaban las relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, representadas por una poligalacturonasa (PDIP\_64460), dos glucanasas (PDIP\_65210 y PDIP\_08210) y dos pectin liasas (PDIP\_57790 y PDIP\_08080). También se analizó una segunda poligalacturonasa (C3411E09) que fue obtenida en una biblioteca obtenida previamente en nuestro laboratorio

(PosharvestP1; Marques *et al.* 2009). En este grupo de genes relacionados con la pared celular también incluimos un fragmento cuya mayor identidad es con una manosiltransferasa (PDIP\_59020).

La función de las manosiltransferasas es la de añadir residuos manosilo a *N*- u *O*-glicanos ligados a proteínas y también están involucradas en la síntesis de glicoconjugados de la pared celular de los hongos (Bowman *et al.* 2005). Además, la mayoría de las proteínas secretadas por hongos filamentosos y levaduras están modificadas mediante la adición de oligosacáridos a residuos de asparagina específicos, proceso que se conoce como (*N*-) glicosilación (Herscovics y Orlean, 1993; Kukuruzinska *et al.* 1987). Los estudios en *S. cerevisiae* han proporcionado gran parte de nuestra comprensión actual sobre la glicosilación de proteínas en los hongos. El análisis de la secuencia mostró que PDIP\_59020 codifica un homólogo de *ScAlg2* de *S. cerevisiae*, una alfa-1,2 manosiltransferasa, que está implicada en las primeras etapas de la (*N*-) glicosilación de proteínas. La delección del gen *agl2* en *S. cerevisiae* produjo mutantes cuyo crecimiento era sensible a la temperatura y que acumulaban una cantidad anormal de Man2GlcNAc2-dolicol difosfato y Man1GlcNAc2- dolicol difosfato (Jackson *et al.* 1989; Jackson *et al.* 1993). En el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella graminicola*, que infecta las hojas del trigo, Motteram y colaboradores (2011) obtuvieron mutantes del gen *MgAlg2*, homólogo a *Alg2* de *S. cerevisiae*. Estos mutantes fueron incapaces de infectar hojas susceptibles de trigo ya que las esporas perdieron la capacidad de alargar los filamentos de las hifas, que es lo que permite la penetración del hongo a través de los estomas. Además, las esporas de los mutantes eran hipersensibles a calcoflúor, agente desestabilizador de la pared celular, y producían proteínas anormales hipo-*N*-glicosiladas. Del mismo modo, en *N. crassa*, se caracterizó otro gen, *cot-5*, homólogo a *Alg2* de *S. cerevisiae*. Los mutantes mostraron una reducción significativa en la extensión y ramificación de las hifas con respecto a la cepa silvestre y, al igual que en los mutantes deletantes de *S. cerevisiae*, eran claramente sensibles a la temperatura además de observarse una reducción en la eficiencia de la (*N*-) glicosilación. Muchas proteínas que son secretadas o localizadas en la pared celular son frecuentemente (*N*-) glicosiladas. Esta modificación es importante para el correcto plegamiento de las proteínas (Helenius y Aebi, 2001). Estos ejemplos ponen de manifiesto que el comportamiento de esta proteína en hongos es similar al que ha sido descrito para levaduras, siendo esencial en el proceso de (*N*-) glicosilación. Además, para algunas proteínas de la superficie implicadas en el desarrollo y la correcta morfología de la hifa éste es un proceso esencial. Por lo tanto, la (*N*-) glicosilación juega un importante papel en la fisiología del hongo. Durante la patogénesis fúngica se produce un aumento del crecimiento y desarrollo dentro del huésped por lo que el hongo requiere de la acción de una gran variedad de proteínas de pared celular y las alteraciones de alguno de los procesos implicados en esta tarea como es la (*N*-) glicosilación puede conllevar no sólo un fenotipo en el que se vea afectada la morfología de la pared celular sino en la atenuación de la virulencia. Estos datos, junto con la expresión diferencial del gen (Figura 42), indican que su función es importante en el proceso de infección participando en todos los cambios que se producen en la pared celular durante el desarrollo del hongo en el huésped. Además, el que sea un proceso fundamental para la biosíntesis de la pared celular explica que en los análisis Northern (Figura 42) tenga una alta expresión también durante el crecimiento en condiciones *in vitro*. Al igual que en otros hongos, esta proteína podría ser una buena candidata para futuros

estudios, tanto para el análisis del fenotipo de las cepas deletantes del gen como para su posible aplicación como diana de nuevos fungicidas.

Los otros genes de este amplio grupo están relacionados con la degradación de la pared celular vegetal. Dos de los genes codifican glucanasas (PDIP\_65210 y PDIP\_08210). Las glucanasas catalizan la hidrólisis de la celulosa en productos de cadena más corta de hasta dos unidades de glucosa (celobiosa). El gen que codifica PDIP\_65210 presenta una expresión elevada en los primeros días de infección y apenas se expresa durante el crecimiento en medio de cultivo, mientras que el segundo gen, a pesar de presentar también una expresión diferencial durante la infección, también se expresa durante el crecimiento en medio PDB (Figura 42). Una posible explicación para la ausencia de expresión del gen de la glucanasa que no se expresa *in vitro*, es la represión por catabolito, ya que el medio PDB contiene glucosa. Este fenómeno de represión de genes que codifican glucanasas ha sido ampliamente documentado en hongos filamentosos (Aro *et al.* 2005; Divon *et al.* 2007). En *M. grisea* se estudió el posible papel en la patogénesis de este hongo de la glucanasa MgEGL1. Se observó un aumento de la expresión del gen a las 72 horas tras la inoculación, lo que sugiere que este gen juega un papel durante la colonización del huésped. Sin embargo, los test de patogenicidad de mutantes que sobreexpresaban la proteína no mostraron alteración ni en el número ni en el tamaño de la lesión en relación al control (Zhou *et al.* 2008). Estos resultados concuerdan con los análisis Northern (Figura 42) donde las dos endoglucanasas de *P. digitatum* tienen su máxima expresión a los 2-3 dpi. Sin embargo, ambos genes presentan perfiles de expresión distintos durante la infección. La expresión del gen que codifica PDIP\_65210 presenta un claro máximo a los 2-3 dpi para disminuir fuertemente a continuación, mientras que la expresión del que codifica PDIP\_08210 es más sostenida a lo largo del tiempo. Además, el gen que codifica la glucanasa PDIP\_08210 también presenta una expresión basal durante el crecimiento en medio PDB, lo que indica que en este gen no hay represión por catabolito, o al menos está muy disminuida. En el hongo fitopatógeno *Pyrenochaeta lycopersici* los niveles de expresión del gen *Pleg1* que codifica una endo-1,4 glucanasa, aumentan durante la infección de tomate, de forma que hay una correlación positiva entre la expresión de este gen y el desarrollo de la enfermedad (Valente *et al.* 2011). Además, su expresión está regulada por la presencia de azúcar o celulosa en el medio. En el hongo fitopatógeno del maíz *Cochliobolus carbonum*, mutantes en los que se eliminó el gen que codifica una exo-beta 1,3 glucanasa tuvieron un crecimiento normal, sin embargo, eran incapaces de degradar el 1,3  $\beta$ -glucano y los mutantes aún mantenían intacta su virulencia (Schaeffer *et al.* 1994). Estos resultados sugieren que las endoglucanasas son enzimas que están implicadas en la patogénesis ya que sus niveles de expresión aumentan durante la infección. Sin embargo, sólo hay unos pocos estudios con mutantes nulos que puedan aportar una información más directa entre endoglucanasas y patogenicidad del hongo. Por ejemplo, en el hongo fitopatógeno *B. cinerea* se clonó el gen *Cel5A*, que codifica una endo-beta-1,4-glucanasa. Aunque su nivel de expresión aumentaba durante la infección de las hojas de tomate, la disrupción del gen resultó en una cepa con idéntica virulencia a la de la cepa silvestre (Espino *et al.* 2005). Maruthachalam y colaboradores (2011) aplicaron la ATMT para introducir mutaciones en conidios de *V. dahliae* mediante inserción aleatoria del T-DNA. Una de las inserciones aleatorias se produjo en un gen que codificaba una endoglucanasa. Observaciones al microscopio sugirieron que este mutante era incapaz de colonizar los vasos

del xilema en plantas inoculadas. Por lo tanto, estos datos excepto en el caso concreto de *B. cinerea* parecen claramente reflejar que hay una relación directa entre de las endoglucanasas con la patogénesis de los hongos fitopatógenos.

Aunque se ha demostrado la posible implicación de las glucanasas fúngicas en la degradación de la pared celular durante el proceso de infección, en la genoteca PDS identificamos otros genes que codifican enzimas degradadoras de la pared celular vegetal y que presentaban mayores niveles de inducción de acuerdo a los resultados de hibridación de la macromatriz y al análisis Northern. Estos motivos nos llevaron a estudiar más en profundidad algunos de estos genes mediante su secuenciación así como mediante la obtención de mutantes en los que se eliminó el gen para poder comprobar su implicación en el proceso de infección.

Un análisis de la secuencia de las dos poligalacturonasas y de una de las pectin liasas mostró que todas presentan péptido señal, que estaría de acuerdo con el carácter de enzimas secretadas al medio. Las tres proteínas presentan puntos isoeléctricos (pI) diferentes, siendo los de PDIGPG2 y PNL1 más ácidos (aproximadamente 6) y el de PDIGPG1 más alcalino (aproximadamente 8). La secuencia de aminoácidos deducida de cada una de las tres pectinasas de *P. digitatum* tiene alta similitud con otras pectinasas de otros hongos filamentosos donde ya han sido caracterizadas. PDIGPG1 corresponde a la poligalacturonasa de *P. digitatum* que se ha descrito en la base de datos del NCBI (GenBank BAA77297.1) y posee un 85 % de identidad con una poligalacturonasa de *P. griseoroseum*. PDIGPG2 presenta una identidad del 75 % con otra poligalacturonasa de *P. griseoroseum* diferente a la anterior y PNL1 presenta una identidad del 75 % con la pectin liasa D de *A. niger*. La similitud entre las dos PGs es del 51 %, lo que indica que son poligalacturonasas claramente diferentes. Ambas PGs poseen dominios pertenecientes a la superfamilia glicosil hidrolasa 28 (GH-28). De acuerdo con los modelos génicos establecidos en *P. digitatum*, el genoma de este hongo contiene 8 poligalacturonasas pertenecientes a la familia GH28, siendo ésta la familia CAZY (enzimas relacionadas con carbohidratos) más enriquecida en comparación con el genoma de *P. chrysogenum* (Marcet-Houbon et al 2012). Todas las enzimas pertenecientes a este grupo están involucradas en la degradación de la pectina de la pared celular. Estas enzimas muestran un estructura típica en hélice  $\beta$  paralela dextrógira, característica de las enzimas que degradan pectina (Herron et al. 2000). Esta disposición coincide con el análisis *in silico* de las dos poligalacturonasas, donde se observa que el 50 % de los aminoácidos poseen una disposición de hélice  $\beta$ . Estos datos pueden indicar que ambas poligalacturonasas poseen un ancestro común.

La expresión de los genes *pg1*, *pg2* y *pnl1* de *P. digitatum* sí muestra diferencias entre ellos (Figura 42). En los análisis Northern se observa que los tres genes tienen una expresión diferencial durante la infección, mientras que su expresión en medio de cultivo es mucho menor. Sin embargo, tanto los niveles de expresión como los perfiles de expresión son diferentes en los tres casos. El gen *pg1* es el único de los tres genes que muestra una gran expresión desde 1 dpi, lo que sugiere su implicación en la etapa más temprana de la infección. El gen *pg2* presenta el máximo de expresión a los 2 dpi, duplicando el valor relativo de expresión respecto a 1 dpi. El hecho de que haya una diferencia temporal en el patrón de expresión de ambos genes, sugiere que aunque ambas enzimas estén presentes durante los

siete días tras la infección, su actividad puede ser secuencial, precediendo PDIGPG1 a PDIGPG2. Comparando el patrón de expresión de los 17 genes analizados en esta Tesis se puede observar que *pg1* y *pg2* forman parte del conjunto de genes que se expresan más tempranamente durante la infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja, lo que sugiere que ambas PGs tienen un rol en los primeros estadios del proceso de infección. Los productos derivados de la degradación de la pared celular debido a la actividad de las poligalacturonasas puede inducir la expresión de otras pectinasas u otras enzimas de degradación de la pared celular resultando en un mayor daño del tejido. Otro mecanismo de regulación de las PGs es la represión catabólica. Se ha descrito que muchos genes que codifican PGs son reprimidos por la presencia en el medio de carbohidratos fácilmente asimilables, como la glucosa (Ruijter y Visser, 1997; Fontana *et al.* 2005; Gattás *et al.* 2009). Esto explica el porqué muchos genes que codifican enzimas degradadoras de la pared celular vegetal no se expresan en medios ricos, ya que la glucosa presente en el medio puede reprimir la expresión de los mismos. Sin embargo, *P. digitatum* expresa los genes *pg1* y *pg2* cuando crece en medio de cultivo PDB, aunque con diferentes patrones: *pg1* sólo se expresa en conidios germinando y primeros estadios de crecimiento del tubo germinativo, mientras que *pg2* tiene una expresión basal que aumenta al esporular. Estos resultados sugieren que ninguno de estos genes está sujeto a represión catabólica.

El gen *pnl1* presenta un máximo de expresión también a los 2 dpi, pero luego su expresión no se mantiene, como ocurre con los genes de las dos poligalacturonasas, sino que cae, lo que sugiere que esta pectinasa sólo se expresa en un determinado momento de la infección y que su función es más específica que la de las poligalacturonasas. Mientras que las poligalacturonasas han sido ampliamente estudiadas, las PLs y su implicación en la virulencia de hongos fitopatógenos lo ha sido en menor medida. A pesar de los pocos estudios llevados a cabo, la mayoría de ellos relacionan claramente el papel de las pectin liasas con el proceso de infección. Por ejemplo, en el oomiceto patógeno de pepino *Pythium splendens* se identificó una PL que estaba relacionada con el proceso de infección y producía una rápida maceración en discos de tomate y de pepino (Chen *et al.* 1998). En otro estudio se aislaron dos genes de *C. gloeosporioides* f. sp. *Malvae*, *pnl-1* y *pnl-2*, que codifican pectin liasas extracelulares que diferían en su expresión en medio de cultivo y durante la infección (Wei *et al.* 2002). También en un estudio de 16 especies de hongos, se observó que *P. italicum* y *P. expansum* tenían la mayor actividad pectin liasa cuando se cultivaban en medios suplementados con pectina (Alana, 1989). La disrupción simultánea de dos genes de pectato liasas, *pelA* y *pelD*, redujo la virulencia de *Nectria haematococca* en guisante, pero sin embargo la disrupción de cada uno de los genes por separado no tuvo efecto alguno (Rogers *et al.* 2000). Mutantes de *C. gloeosporioides* en los que se eliminó un gen que codifica una pectato liasa redujo el tamaño de la lesión en frutos de aguacate en más de un 45 % (Yakoby *et al.* 2001).

Estos datos sobre la expresión de los genes en infección y durante el crecimiento *in vitro* deja claro que la regulación de las enzimas degradadoras de pared celular es muy compleja y está sometida a varios factores, como diferentes fuentes de carbono (Wubben *et al.* 2000; Olsson *et al.* 2003) o el pH del medio (de Vries y Visser, 2001; Peñalva y Arst, 2002). Como la producción de enzimas extracelulares en gran cantidad son procesos que consumen mucha

energía, la regulación dependiente por carbono de estos genes asegura que solamente se produzcan bajo condiciones en las que el hongo necesite utilizar los polímeros de la planta como fuente de energía y carbono. Además, se han localizado elementos de regulación en los promotores de los genes de enzimas de degradación de la pared celular incluyendo sitios de unión al represor por catabolito de carbono (CRE), elementos CCAAT y sitios de unión para activadores transcripcionales o factores de modulación de la expresión (Area, PacC o XlnR) (Aro *et al.* 2005). En el análisis de las secuencias de los promotores de los genes *pg1*, *pg2* y *pnl1* también se han localizado varios motivos de unión a estos reguladores transcripcionales. Sitios de unión a PacC, cuya secuencia consenso es 5'-GCCAAG-3', se han identificado en *pnl1* y *pg1*. Como se ha mencionado extensamente en el apartado 2 de resultados de esta Tesis, este factor está implicado en la regulación de la expresión de genes mediado por pH. En *pnl1* también se ha localizado un motivo CCAAT. Esta secuencia es uno de los elementos *cis* más comunes presente en las regiones promotoras de numerosos genes (Kato, 2005). Es de destacar que varios de los motivos comunes en los promotores de los tres genes están relacionados con la limitación de nutrientes. Por ejemplo, GCN4 (presente en *pg1*) es un activador transcripcional en respuesta a la necesidad de aminoácidos (Drynsdale *et al.* 1995); GCR1 (presente en *pnl1* y *pg2*) es un activador transcripcional de genes relacionados con la glucólisis (López y Baker, 2000); PHO4 (presente en *pg1* y *pg2*) se activa como respuesta a la limitación de fosfato (Svaren *et al.* 1994); NIT2 (presente en *pg1*, *pg2* y *pnl1*) que es un regulador central de requerimiento de nitrato (Camargo *et al.* 2007). Por lo tanto, estos datos indican que principalmente estos genes están regulados por la falta o necesidad de nutrientes. Posiblemente una vez el hongo detecta que tiene disponibilidad de nutrientes inactiva la producción de enzimas extracelulares que son procesos que consumen mucha energía. Esto explica la no expresión en medio de cultivo *in vitro*.

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que los mutantes de delección de *P. digitatum* que carecen del gen *pg1* ( $\Delta pg1-8$  y  $\Delta pg1-10$ ), del gen *pg2* ( $\Delta pg2-0$  y  $\Delta pg2-13$ ) o del gen *pnl1* ( $\Delta pnl1-6$  y  $\Delta pnl1-7$ ) vieron reducida su virulencia en frutos de naranja con respecto a la cepa silvestre en aproximadamente un 25 % (Figuras 62, 63 y 64). Además, los mutantes  $\Delta pg2$  mostraron también una disminución de la maceración del tejido. Un defecto similar en la habilidad la macerar el tejido ya ha sido observado en mutantes de las bacterias fitopatógenas *Erwinia*, *Pseudomonas*, y *Ralstonia sp.*, deficientes en pectinasas (Barras 1994; Collmer y Keen 1986). En varios hongos se han obtenido mutantes nulos en genes relacionados con la degradación de la pared celular, que presumiblemente estarían involucrados en patogenicidad. En muchos casos se ha confirmado su importancia en la misma (Perpetua *et al.* 1996; Wassmann y Van-Etten 1996). La disrupción de genes individuales de pectinasas en los hongos fitopatógenos *A. flavus* y *B. cinerea* causaron un moderado descenso de la virulencia, similar al que se ha obtenido en los ensayos llevados a cabo en este trabajo. La disrupción del gen *P2c* de *A. flavus*, que codifica una endoPG, conlleva una disminución de la infección en algodón de entre un 23 y un 33 %. Sin embargo, la disrupción del gen *Bcpg1* de *B. cinerea* no mostró ningún efecto en la infección primaria, aunque sí un descenso de la expansión de la lesión, indicando que esta endoPG no es importante para la penetración y las etapas iniciales de la infección, pero sí que tiene un efecto en la dispersión del hongo, reduciendo la virulencia del hongo en un 20 % (Shieh *et al.* 1997; Ten Have *et al.* 1998). Los mutantes de *A. citri* en los que se eliminó una endoPG vieron

reducida significativamente su habilidad para causar los síntomas de la podredumbre negra en cítricos (Isshiki *et al.* 2001). Sin embargo, en la mayoría de los estudios llevados a cabo en hongos fitopatógenos con mutantes deficientes en alguna pectinasa no se ha observado un descenso de la virulencia, por lo que no se puede asegurar en todos los casos que estas enzimas constituyan un factor de virulencia. El caso más extensamente estudiado es el de *Cochliobolus carbonum*. En este hongo, la eliminación de una celobiohidrolasa (Sposato *et al.* 1995), dos  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas (Görlach *et al.* 1998), una endoPG (Scott-Craig *et al.* 1990), y una exoPG (Scott-Craig *et al.* 1998) no resultó en una reducción alguna de la virulencia en maíz. Incluso el empleo de una línea mutante en la que se eliminaron tanto una endoPG como una exoPG (Scott-Craig *et al.* 1998) tampoco tuvo efecto en la virulencia. Una situación similar ha sido descrita en mutantes de delección de otros hongos fitopatógenos deficientes en enzimas degradadoras de pared celular. Un mutante de *Cryphonectria parasitica* deficiente en una endoPG (Gao *et al.* 1996) no presenta diferencias en patogenicidad respecto de la cepa silvestre, sugiriendo que esta enzima no es esencial para el proceso de patogénesis.

Hasta la fecha, en ninguno de los casos descritos en la bibliografía se ha encontrado ningún caso en el que la reducción de la virulencia sea del 100 %. La disrupción individual de genes que codifican enzimas de degradación de la pared celular no puede eliminar la virulencia del patógeno ya que diferentes isoenzimas pueden estar actuando activamente durante la misma etapa de la infección, sinérgicamente, al mismo tiempo o durante varias fases de la infección. Por ejemplo, *Fusarium solani*, que posee cuatro genes que codifican otras tantas pectato liasas que actúan sinérgicamente para producir una rápida degradación de la pectina y aunque la disrupción individual de dos de ellos (*peIA* y *peID*) no afectó a la virulencia, cuando ambos, *peIA* y *peID*, fueron delecionados sí se observó una pérdida de la misma (Rogers *et al.* 2000). No es difícil encontrar una explicación para esta observación. La pared celular de las plantas es una estructura heterogénea y dinámica, además puede haber diferencias en el grado de metilación y acetilación, en el grado de entrecruzamiento e inclusión de otros polímeros. Para que un microorganismo pueda degradar un sustrato complejo debe poseer diversas enzimas con especificidades diferentes. Probablemente, múltiples factores incluyendo otras enzimas degradadoras de pared celular y condiciones del medio ambiente estarán participando conjuntamente en la virulencia del hongo.

Las enzimas de degradación de la pared celular existen como familias multigénicas, de forma que la eliminación de un miembro de la familia se ve compensada por la acción de otro miembro. Una posible solución para discernir el papel de este tipo de enzimas sería la utilización de mutantes deletantes múltiples o la delección de reguladores transcripcionales que actuaran a un nivel superior afectando a múltiples enzimas degradadoras de pared celular. En este sentido, los hongos normalmente controlan la expresión de las enzimas de degradación de la pared celular a través de la fosforilación de proteínas, catalizadas por proteínas quinasas que forman parte de las vías de transducción de señales. Entre estas proteínas quinasas, la proteína quinasa SNF1 (del inglés; Sucrose NonFermenting 1) está implicada en las respuestas a estrés nutricional y ambiental (Celenza *et al.* 1986). El rol de SNF1 en la virulencia de hongos ha sido examinado en varios hongos fitopatógenos. Mediante la delección del gen SNF1 en el hongo *F. oxysporum* se obtuvieron mutantes que

eran incapaces de producir enzimas de degradación de pared celular. Este mutante era incapaz de utilizar algunas fuentes de carbono y presentó una reducción de la virulencia (Ospina-Giraldo *et al.* 2003). El gen de la quinasa SNF1 (*CcSNF1*) en el hongo patógeno del maíz *C. carbonum* es requerido para la expresión de numerosas enzimas de degradación de la pared celular y también para la penetración del hongo en el huésped (Tonukari *et al.* 2000). Lee y colaboradores (2009) obtuvieron mutantes nulos del gen ortólogo de *SNF1* en el hongo *Gibberella zeae* y observaron que en los mutantes resultantes se redujo tanto la expresión de genes que codifican enzimas de degradación de la pared celular como la virulencia. En el hongo fitopatógeno *V. dahliae* también se obtuvieron resultados similares (Tzima *et al.* 2011). La expresión de las enzimas de degradación de la pared celular en los mutantes no se indujo en medio de inducción y además la severidad de la enfermedad en tomate y berenjena se redujo en una media del 87 %. Estos datos sugieren que aunque se actúe sobre la expresión de varias enzimas de degradación de la pared celular, no es suficiente para reducir completamente la virulencia del hongo, aunque sí que se demuestra que son importantes factores de patogénesis.

#### **4.4 Resistencia a fungicidas**

Uno de los principales inconvenientes actuales del uso de fungicidas es la aparición de aislados resistentes. Como resultado de la disminución de la eficacia de los mismos se producen numerosas pérdidas en agricultura. En la genoteca PDS se han localizado varias ESTs relacionadas con procesos de resistencia a fungicidas. Entre ellas destacan las ESTs correspondientes a un transportador PMR4 (PDIP\_53810), dos transportadores MFS (PDS PDIP\_55680 y PDIP\_09580), una 14-alfa esterol demetilasa Cyp51B (PDIP\_01820) y una proteína CipC (PDIP\_45260).

El análisis Northern de todos estos genes reveló que únicamente el que codifica una 14-alfa esterol demetilasa Cyp51B (CYP51) no mostraba una expresión diferencial durante el proceso de infección (Figura 42). Esta CYP51 pertenece a la familia de citocromos P450 y juega un papel clave en la ruta de biosíntesis de ergosterol en hongos, de ahí su alto nivel de expresión en condiciones *in vitro*. El ergosterol regula la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular y es esencial para la supervivencia celular (Rodríguez *et al.* 1985; Lees *et al.* 1995; Parks *et al.* 1995). Por este motivo la síntesis de ergosterol constituye una importante diana para el diseño de inhibidores antifúngicos frente a diversos hongos fitopatógenos, incluyendo especies como *M. grisea* (Talbot *et al.* 1993) o *P. digitatum* (Hamamoto *et al.* 2000). Sin embargo, mutaciones en la 14-alfa esterol demetilasa provocan una disminución en la afinidad de los fungicidas inhibidores de la demetilación (DMIs) que son el grupo más importante de agentes antifúngicos usados en agricultura. La resistencia a los DMIs ha sido estudiada en varias especies de hongos patógenos de plantas como *Blumeria graminis* (Wyand y Brown, 2005), *Monilinia fructicola* (Luo y Schnabel, 2008), *Mycosphaerella graminicola* (Brunner *et al.* 2008), *P. digitatum* (Hamamoto *et al.* 2001 y Zhao *et al.* 2007) y *F. graminearum* (Yin *et al.* 2009). En *P. digitatum*, se sabe que la sobreexpresión gen *PdCYP51B* conlleva resistencia a los DMIs y se produce por la presencia de una única inserción de 199 pb en la región promotora (Sun *et al.* 2011). Dentro del proyecto de investigación donde se encuadra esta Tesis se encuentra el grupo de la Dra.



Paloma Sánchez-Torres (IVIA), que está llevando a cabo un análisis en profundidad de este gen y su implicación en la resistencia a los fungicidas en *P. digitatum*. Los datos obtenidos en el análisis Northern muestran una alta expresión de este gen tanto en infección como en crecimiento en medio de cultivo, lo que sugiere que este gen no es esencial durante el proceso de infección, pero sí fundamental para el crecimiento celular. En *P. digitatum* han sido descritos 3 genes que codifican citocromos P450 esteroles 14 $\alpha$ -demetilasa [*PdCYP51A* (Hamamoto *et al.* 2000); *PdCYP51B* y *PdCYP51C* (Sun *et al.* 2011)], sin embargo, en la genoteca PDS solamente aparece *PdCYP51B*. Una posible explicación a este hecho podría deberse a que nuestro aislado es resistente a imazalil y de ahí la alta expresión observada en *PdCYP51B* (Sun *et al.* 2011).

El gen *PMR4* codifica un transportador ABC. En *P. digitatum* han sido clonados y secuenciados cuatro genes que codifican transportadores ABC [*PMR1* (Nakaune *et al.* 1998), *PMR3* (AB164459.1), *PMR4* (AB164460.1) y *PMR5* (Nakaune *et al.* 2002)]. La función de los transportadores ABC *PMR1* y *PMR5* de *P. digitatum* en la resistencia a los agentes antifúngicos ha sido bien documentada, aunque no hay estudios relacionados con *PMR4*. Ambos genes incrementaron su expresión en presencia de diferentes componentes tóxicos (Nakaune *et al.* 1998, 2002). Estos transportadores se encuentran en la membrana y son responsables del transporte de una amplia variedad de diferentes sustancias tóxicas endógenas y exógenas a través de membranas mediante el uso de la energía derivada de la hidrólisis de ATP (Higgins, 1992). El papel de los transportadores ABC en el flujo de salida de los fungicidas azoles ha sido descrito en varios hongos filamentosos como *Mycosphaerella graminicola* (Zwiers *et al.* 2000), *P. digitatum* (Nakaune *et al.* 1998) y *B. cinerea* (Hayashi *et al.* 2001). La expresión diferencial en infección de este transportador en *P. digitatum* sugiere que no sólo es importante como mecanismo de resistencia a fungicidas sino también en el proceso de infección. En la interacción hongo-planta, los transportadores ABC pueden tener diferentes funciones, permitiendo tanto la secreción de factores de virulencia durante el proceso de infección (De Waard, 1997; 2006) como protegiendo a los hongos de los componentes tóxicos producidos por la planta (Del Sorbo *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 2001). En otros hongos fitopatógenos también se ha relacionado el papel de estos transportadores ABC con la virulencia de los mismos, como *ABC1* en *M. grisea* (Urban *et al.* 1999), *GpABC1* en *Gibberella pulicaris* (Fleilner *et al.* 2002) y *Mgatr4* en *M. graminicola* (Stergiopoulos *et al.* 2002). Urban y colaboradores (1999) obtuvieron cepas mutantes de *M. grisea* carentes del gen *ABC1* que no presentaron hipersensibilidad a un número diferente de drogas, pero sin embargo, eran incapaces tras su inoculación en hojas de arroz de continuar con la infección poco después de la penetración. En *M. graminicola*, también se analizó la implicación en la virulencia de varios transportadores ABC. La disrupción del gen *Mgatr4* produjo líneas mutantes que independientemente del cultivar fueron menos virulentas y mostraron un menor crecimiento intercelular en el apoplasto de hojas de trigo. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que al igual que en los casos mencionados anteriormente, *PMR4* podría ser un factor de virulencia que incrementa su expresión durante la infección y cuya función podría ser proteger al hongo contra los componentes fungitóxicos producidos por el fruto como por ejemplo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se ha visto en *B. cinerea* (Pane *et al.* 2008), aunque la confirmación de este extremo requiere de estudios adicionales.

Junto con los transportadores ABC, los transportadores MFS (major facilitator superfamily) son las bombas de expulsión más importantes que intervienen en la protección de los hongos contra los fungicidas (Stergiopoulos *et al.* 2002; De Waard *et al.* 2006). Por ejemplo, *Bcmfs1* es un miembro de la familia de transportadores MFS de *B. cinerea* que está involucrado en el transporte al exterior de la célula tanto de fungicidas como de componentes naturales tóxicos (Hayashi *et al.* 2002). Al igual que ocurre con el gen *PRM4*, el gen *MFS1* de *P. digitatum* también posee una expresión diferencial durante la infección (Figura 42). Recientemente Wang y colaboradores (2012) han clonado el gen *Pdmfs1*, que codifica un transportador MFS de *P. digitatum* diferente al gen *MFS1* previamente depositado en la base de datos del NCBI y que corresponde a la entrada PDIP\_09580 del genoma. Mutantes nulos  $\Delta Pdmfs1$  son más sensibles al fungicida imazalil y su patogenicidad sobre frutos cítricos es menor que la de la cepa parental, lo que sugiere que de algún modo este transportador juega un importante papel en la virulencia de *P. digitatum*. PDIP\_55680 codifica un segundo transportador MFS. Este transportador es diferente a los otros mencionados, pero debido a que no se encuentra presente en la macromatriz no se pudo obtener datos adicionales sobre su expresión.

CipC (PDIP\_45260) es una pequeña proteína conservada con función desconocida. El nombre de CipC proviene de "proteína inducida por concanamicina" (concanamycin-induced protein), ya que el gen se sobreexpresa en *A. nidulans* en respuesta a la adición exógena del antibiótico concanamicina A (Melin *et al.* 2002). En *S. sclerotiorum* se identificaron siete ESTs correspondientes a CipC durante la interacción con *Brassica napus*, de tal forma que este gen fue clasificado como gen asociado a patogénesis (Li *et al.* 2004). En el caso del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* se ha sugerido que la proteína CipC ayuda a la supervivencia en el suelo a través de la inactivación de antibióticos producidos por los microorganismos del suelo (El-Bebany *et al.* 2010). En *Verticillium alboatrum* también se ha encontrado como un gen asociado a patogénesis (Mandelc *et al.* 2009). En contraposición, la delección de un ortólogo a *cipC* en *Stagonospora nodorum* no atenuó la patogenicidad (Tan *et al.* 2008). Los antecedentes encontrados en la bibliografía junto con la alta expresión observada y su expresión diferencial en infección sugieren que CipC está implicada en el proceso de infección, probablemente participando en la detoxificación de los compuestos de defensa producidos por el fruto, pero este extremo no está confirmado. Además, destaca que es el unigen con el quinto valor de inducción más alto en la macromatriz, por delante incluso de las enzimas que tienen un mayor número de ESTs como son las enzimas de degradación de la pared celular y todas las proteasas, excepto la aspergillopepsina y la serin peptidasa. Posiblemente, estará inducida por algún compuesto producido por el fruto al igual que la proteína con la que presenta la mayor similitud que es inducida por concanamicina. Por esto, CipC sería una importante diana a tener en cuenta para realizar un estudio más en profundidad de su función y su implicación como factor de virulencia a través de estudios de patogenicidad con mutantes en los que se elimine este gen.

A pesar de la cantidad de genes identificados en la genoteca PDS que están relacionados con fungicidas, no se profundizó en el estudio funcional de los mismos porque dentro del proyecto de investigación en el que se enmarca esta Tesis también participa el grupo de la Dra. Paloma Sánchez del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), que ha

realizado este tipo de aproximación con varios de los genes relacionados con fungicidas identificados en el presente trabajo.

#### **4.5 Glucólisis**

Otro grupo de genes que se encuentra muy representado en la genoteca PDS está relacionado con la glucólisis. Se han aislado varios genes que codifican una triosafosfato isomerasa (PDIP\_81910), una enolasa (PDIP\_68590) y una piruvato quinasa (PDIP\_70570). Todos los productos derivados de la acción de las enzimas degradadoras de la pared celular sobre el fruto son utilizados por el hongo para la obtención de energía mediante esta vía, sugiriendo que la utilización de la glucosa es un proceso crítico para la virulencia de *P. digitatum* como se ha visto en otros casos como el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Danson *et al.* 2000). Por lo tanto, es probable que la principal ruta de metabolización de energía utilizada por los hongos durante la infección sea la glucólisis. En el patógeno del maíz, *Blumeria graminis*, estudios genómicos utilizando ESTs y SAGE han mostrado que durante la infección también se expresan abundantemente genes requeridos para la glucólisis (Thomas *et al.* 2001, 2002).

#### **4.6 Transducción de señales**

Las ESTs más representadas en la genoteca PDS están relacionadas con proteasas y enzimas degradadoras de pared celular. Esta abundancia de genes hidrolíticos era en cierta medida esperada, ya que son enzimas extracelulares que actúan directamente sobre el huésped, degradando la pared celular y causando la muerte celular. Pero también hay otros genes que actúan regulando muchas funciones del hongo y no son muy abundantes, ya que un factor puede regular multitud de funciones. Así, la hibridación de la macromatriz reveló la presencia de genes poco representados, pero con alto valor de inducción, lo que sugiere que son importantes para la virulencia de *P. digitatum*.

El unigen que codifica PDIP\_6428 tiene homología con una fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-quinasa), que pertenece a una familia de enzimas involucrada en la vía TOR (target of rapamycin). Esta vía de señalización es un mecanismo bien conservado que controla el crecimiento celular en eucariotas, principalmente en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Martin *et al.* 2005). Aunque el rol de la vía TOR en la virulencia de hongos fitopatógenos aún no ha sido ampliamente estudiado, Zhang y colaboradores (2010) mostraron que la eliminación del gen *FgTEP1*, que está vinculado a la vía PI3-quinasa, produjo una reducción de la virulencia de *F. graminearum* sobre trigo. En *Candida albicans* se ha demostrado que la PI3-quinasa tiene relación directa con el transporte vesicular intracelular, el crecimiento filamentoso y la virulencia (Kitanovic *et al.* 2005). El mutante nulo deficiente en PI3-quinasa es avirulento y además presenta una disminución de la secreción de proteasas aspárticas y un aumento de la sensibilidad contra antimicóticos e iones metálicos. Efectos similares han sido observados en el hongo patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, donde se comprobó que la señalización mediada por PI3-quinasa es requerida para la virulencia (Hu *et al.* 2008). Recientemente se ha demostrado que esta proteína controla los estadios más tempranos de la autofagia (Noda *et al.* 2010). La autofagia es un proceso mediante el cual las células reciclan el citoplasma y los orgánulos dañados

durante las situaciones de estrés, tales como la falta de nutrientes. La degradación y el reciclaje de los componentes celulares a través de la autofagia juega un papel vital en el estilo de vida de los hongos filamentosos (Pollack *et al.* 2009). En la mayoría de las especies estudiadas hasta ahora la autofagia es indispensable para la remodelación celular a gran escala durante la reproducción sexual y asexual, la germinación de conidios, y la supervivencia en condiciones de agotamiento de los nutrientes y también en el proceso de infección (Bartoszewska y Kiel 2011). La autofagia es esencial para la generación de la turgencia de apresorios y la patogénesis de *M. oryzae* (Kershaw y Talbot, 2009). La alta inducción del unigen correspondiente a PDIP\_6428 sugiere que la autofagia podría ser importante durante el proceso de infección de *P. digitatum*.

#### **4.7 Otras proteínas**

En el análisis de los genes presentes en la genoteca PDS destaca también la presencia de varios genes relacionados con la ubiquitinación: una enzima de conjugación de ubiquitina (PDIP\_31680) y una ubiquitin ligasa (PDIP\_66270). Estas proteínas intervienen en la proteólisis a través del proteosoma y juegan un importante papel en la respuesta a varios estreses, tales como limitación de nutrientes, exposición a metales pesados o choque térmico. McCafferty y Talbot (1998) identificaron 3 nuevas ubiquitinas del hongo *M. grisea* que tenían una alta expresión durante los estadios iniciales de la colonización de la planta, sugiriendo que éstas tienen un importante papel durante situaciones de estrés eliminando proteínas dañadas o anormales vía proteosoma. Del mismo modo, Kornitzer (2006) sugiere que la morfogénesis celular del hongo y su virulencia están conectadas. Los efectos de degradación de proteínas afectan a la morfogénesis debido a la modulación de la concentración de reguladores del ciclo celular y de los factores de transcripción. Lo que sugiere que durante el proceso de infección el hongo libera estas proteínas como mecanismo de defensa frente a los diferentes tipos de estrés a los que le somete la planta y como medio para variar su morfología adaptándola a los requerimientos del proceso de infección.

De acuerdo con los experimentos de hibridación de la macromatriz, la mayor inducción corresponde a un gen que codifica una proteína extracelular que presenta un dominio taumatina (PDIP\_76190), del que se han secuenciado 2 ESTs. Estas proteínas han sido clásicamente asociadas con plantas como proteínas PR, de la familia PR5, que se caracterizan por proteger a las plantas contra el estrés osmótico, contra el ataque de patógenos y de los efectos nocivos de la congelación (Velazhahan *et al.* 1999; An lovar y Dermastia, 2003). En hongos, este tipo de proteínas han mostrado actividad beta-1,3-endo-glucanasa y unión a beta-1,3-glucano (Grenier *et al.* 2000). Lo que podría sugerir un posible papel en la degradación de la pared celular de las plantas durante la infección. Sin embargo, aún no ha sido bien caracterizada y su papel aún resulta desconocido, pero su alta expresión hace preveer que puede ser importante para la virulencia de *P. digitatum* y sería necesario en un futuro relizar un estudio en profundidad.

Además de los grupos de genes/proteínas ya mencionados, en la genoteca PDS se ha encontrado una cantidad significativa de genes que codifican proteínas con función desconocida o hipotética.

Al igual que en otros hongos necrótrofos, podríamos considerar que la podredumbre producida por *P. digitatum* consiste en una progresiva desorganización del tejido del fruto de naranja causando la maceración del mismo. La degradación de la pared celular mediante la secreción de enzimas constituye una de las señales de identidad durante la infección de los hongos fitopatógenos necrótrofos. La acción de las enzimas degradadoras de pared celular facilita el crecimiento intercelular del hongo mediante la desestabilización de la integridad celular del huésped (Kikot *et al.* 2009). Esta maceración es el resultado de la acción conjunta de varias enzimas hidrolíticas, incluyendo pectinasas y endoglucanasas. En este proceso actúan también varias proteasas, que son las responsables de la degradación de proteínas, tanto de la pared celular como de otras proteínas. La destrucción de las paredes celulares causa la lisis celular y permite el libre acceso a los nutrientes celulares. Estos nutrientes son asimilados por el hongo a través de sistemas de transporte. De hecho, en la genoteca PDS se identificaron varios transportadores de aminoácidos y oligopéptidos (PDIP\_00120, PDIP\_26110 y PDIP\_80310). Además, el hongo tiene que hacer frente a las defensas del fruto durante el proceso de infección y para ello ha desarrollado sistemas de defensa como son los transportadores ABC y MFS que protegen a los hongos de los componentes tóxicos o enzimas de detoxificación que ya han sido mencionados anteriormente.

### **5. Proteasas**

Entre los unigenes más abundantes en la genoteca PDS se encontraron varios con homología a varias proteasas: una endopeptidasa aspártica (PDIP\_82060, con 53 ESTs), una aspergillopepsina (PDIP\_06020, con 13 ESTs), una tripeptidil peptidasa S8 (PDIP\_12220, con 12 ESTs), y una carboxipeptidasa 5 (PDIP\_71590, con 7 ESTs). Casi un 23 % de las ESTs de la genoteca PDS (85 ESTs de un total de 371) pertenecen a genes que codifican proteasas/peptidasas. En total, se han identificado 5 unigenes que codifican proteasas de los 83 que se han localizado en la secuenciación del genoma (Marcet-Houben *et al.* 2012). Además de los ya citados, se han identificado tres ESTs con similitud a una serin peptidasa (PDIP\_67670). Debido a la cantidad de ESTs que codifican proteasas y al alto valor de inducción de alguno de los genes (Tabla 13), se realizó un análisis de expresión de cinco de ellos. El análisis Northern (Figura 42) mostró una expresión diferencial de todos los genes analizados durante el proceso de infección, aunque con diferentes perfiles de expresión a lo largo del tiempo.

La pared celular vegetal contiene celulosa, pectina y hemicelulosa como elementos más abundantes, pero también contiene proteínas. Las proteínas de la pared celular vegetal son generalmente proteínas glicosiladas ricas en los aminoácidos hidroxiprolina, prolina y glicina. Otro grupo importante de proteínas de la pared celular vegetal son las proteínas arabinogalactanos (Cassab *et al.* 1998). Por esta razón, entre el arsenal de enzimas degradadoras además de las poligalacturonasas, pectato o pectin liasas, celulasas y xilanasas, muchos hongos fitopatógenos producen proteasas (Dobinson *et al.* 1997; Carlile *et al.* 2000). Las posibles dianas de las proteasas fúngicas incluyen glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas tales como las extensinas, las cuales juegan un papel importante en la extensión y unión de la pared celular de las plantas (Showalter, 1993). Las proteínas del huésped son la principal fuente de nitrógeno para los hongos fitopatógenos y por lo tanto,

las proteasas juegan un papel en la nutrición. Además, las proteasas pueden contribuir a la inactivación de proteínas de respuesta de la defensa de las plantas, tales como quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas (Catanzariti *et al.* 2010; Naumann *et al.* 2011).

En los hongos se han identificado aspartato, cisteín, metalo, serin y treonin proteasas, así como otras clases sin caracterizar (Rawlings *et al.* 2004). Ries y Albersheim (1973) fueron los primeros que demostraron que el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemithianum* secretaba una proteasa activa de 25 KDa y pH óptimo a 8,6 cuando crecía en paredes celulares de plantas o en medio con nutrientes artificiales. Ésta fue la primera proteasa extracelular obtenida en su forma pura a partir de un hongo fitopatógeno. En los últimos años se han aislado varias proteasas extracelulares producidas por microorganismos fitopatógenos. Entre éstas prevalecen las serin proteasas, que se dividen en enzimas del tipo tripsina o subtilisina. Del primer tipo se han encontrado en *Cochliobolus carbonum* (Murphy *et al.* 1996), *Verticillium dahliae* (Bidochka *et al.* 1999), *Stagonospora nodorum* (Carlile *et al.* 2000), y *Phytophthora infestans* (Gvozdeva *et al.* 2004). Y del tipo subtilisina en *C. carbonum* (Murphy *et al.* 1996), *P. infestans* (Gvozdeva *et al.* 2004), *Acremonium typhium* (Reddy *et al.* 1996), *Magnaporthe poae* (Sreedhar *et al.* 1999) y *F. oxysporum* (Di Pietro *et al.* 2001). Entre las proteasas extracelulares de hongos fitopatógenos las proteasas aspárticas también están bastante extendidas. Éstas incluyen proteasas producidas por *B. cinerea* (Movahedy y Heale, 1990), *Cryphonectria parasitica* (Choi *et al.* 1993) o *Glomerella cingulata* (Clark *et al.* 1997). También, aunque en menor medida, están representadas las cistein proteasas, como en el hongo *Pyrenopeziza brassicae* (Ball *et al.* 1991). Además de proporcionar al patógeno aminoácidos como nutrientes, la actividad proteolítica podría estar unida a la patogénesis, por ejemplo, en la desestabilización de la pared celular a través del ataque sobre las proteínas estructurales que están involucradas en el ensamblaje y la integridad de la pared (Hall y Cannon, 2002) o como en la bacteria *E. chrysanthemi*, donde una metaloproteasa extracelular cataliza la transformación de una pectato liasa en la forma madura de esta enzima que es crucial para la maceración del tejido de la planta (Shevchik *et al.* 1998). También se ha propuesto que ciertos péptidos liberados por la acción de proteasas extracelulares de microorganismos fitopatógenos pueden actuar como elicitores, activando reacciones de protección de la planta (Ryan y Pearce, 2003). En *C. albicans* se ha sugerido que las proteasas aspárticas podrían estar también involucradas en la adhesión de los hongos patógenos a las células huésped, facilitando su invasión a través de la degradación del citoesqueleto del huésped (Borg-von Zepelin *et al.* 1999). Jia y colaboradores (2000) observaron el caso de una proteasa que actuaba como un gen de avirulencia. El gen AVR-Pita del hongo *M. grisea* codifica una metaloproteasa que posee propiedades similares a las proteínas efectoras bacterianas. En el arroz se detectó un gen de copia única (*Pi-ta*) que codifica un receptor citoplasmático del tipo NBS que une el producto procesado del gen AVR-Pita para activar las defensas de respuesta contra el hongo. Este modelo es una excelente herramienta para conocer el mecanismo molecular de resistencia de las plantas.

Sólo unos pocos estudios han examinado el papel de las proteasas en los hongos patógenos de plantas (Murphy y Walton, 1996; Plummer *et al.* 2004). Sólo en algunas especies de hongos filamentosos necrótrofos, como son *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*, se ha correlacionado la actividad proteolítica con el desarrollo de los síntomas de la infección (Poussereau *et al.*

2001; Ten Have *et al.* 2004). En *M. grisea* la eliminación del gen que codifica una serin proteasa resultó en una disminución de la esporulación y del desarrollo de apresorios, por lo que la cepa mutante era menos patogénica sobre arroz (Donofrio *et al.* 2006). Sin embargo, son mucho más abundantes los casos en los que la eliminación de un gen que codifica una proteasa no altera la virulencia. Por ejemplo, la inactivación dirigida del gen que codifica una tripsina no tuvo efecto en la virulencia en los patógenos de cereales *C. carbonum* y *S. nodorum* (Bindschedler *et al.* 2003; Murphy y Walton 1996). Del mismo modo, la inactivación de una subtilasa en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no tuvo efecto en el crecimiento del micelio, la esporulación o la patogenicidad sobre plantas de tomate (Di Pietro *et al.* 2001). Ten Have y colaboradores (2010) obtuvieron mutantes simples y dobles de cinco proteasas aspárticas de *B. cinerea* diferentes y ninguno de ellos mostró una reducción de la virulencia. Del hongo del marchitamiento vascular, *V. dahliae*, se obtuvieron mutantes en los que se deletó un gen que codifica una proteasa del tipo tripsina. Como en los casos anteriores, los mutantes no mostraron alteración del crecimiento ni de la patogenicidad (Dobinson y Grant, 2004). En el hongo patógeno de la madera del castaño, *Cryphonectria parasitica*, se estudiaron cuatro genes que codificaban proteasas aspárticas que presentaban una expresión diferencial durante el proceso de infección. Los mutantes de delección de cada uno de estos genes no mostraron diferencias en crecimiento o esporulación (Jacob-Wilk *et al.* 2012).

Todos los genes de proteasas analizados en esta Tesis presentan una expresión diferencial durante el proceso de infección, aunque con patrones de expresión diferentes. Es de destacar que todos, menos el de la carboxipeptidasa, presentan un máximo de expresión a día 1 de crecimiento *in vitro*, siendo bastante acentuado en el caso de la endopeptidasa aspártica. Probablemente, una vez el hongo detecta que se encuentra en un ambiente adecuado activa la expresión de los genes de virulencia, como son tanto las proteasas como las enzimas de degradación de la pared celular. Que la carboxipeptidasa no se detecte *in vitro* puede sugerir una activación secuencial de las proteasas a medida que se produce la colonización del huésped. De este modo, la endopeptidasa aspártica y la serin proteinasa serían las primeras en actuar.

Las proteasas aspárticas se expresan en estadios tempranos de la infección en varios hongos necrótrofos (Thomas *et al.* 2002; Ten Have *et al.* 2004; Rolland *et al.* 2009). Estudios genómicos realizados en el hongo patógeno *B. graminis* mostraron que algunas proteasas se expresaban en los estadios de spora, spora germinada y formación de apresorio, antes de la penetración del huésped (Thomas *et al.* 2002). Hay que destacar los casos de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, dos hongos fitopatógenos necrótrofos que utilizan una estrategia similar de infección acidificando el tejido del huésped mediante la secreción de ácidos orgánicos (oxálico o ácido cítrico) (Magro *et al.* 1984; Verhoeff *et al.* 1988; Cotton *et al.* 2003), que además de producir numerosas enzimas de degradación de la pared celular también producen proteasas (Manteau *et al.* 2003). *B. cinerea* secreta varias proteasas ácidas durante la patógenesis. Movahedi y Heale (1990) purificaron y caracterizaron una proteasa aspártica de zanahorias infectadas. Su secreción se producía antes incluso que las enzimas pectolíticas y estaba acompañada por la muerte de las células vegetales. Ten Have y colaboradores (2004) describieron una familia de 5 proteasas aspárticas que habían sido detectadas

durante la infección de varias especies de plantas. En *S. sclerotiorum* se obtuvo una proteasa aspártica, SsACP1, que era secretada durante el proceso de infección en varios huéspedes (Poussereau *et al.* 2001). Estos datos unidos a que la proteasa ácida aspártica en *P. digitatum* es la más abundante y posee una expresión diferencial durante el proceso de infección sugiere que todos estos hongos relacionados se comportan de una forma similar durante la infección en lo que se refiere a la producción de esta proteasa y que ésta juega un importante papel, sobretodo en el establecimiento de la misma.

La síntesis de proteasas en la mayoría de los casos está estrechamente regulada y responde a la combinación de estímulos medioambientales, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, el pH ambiental y la temperatura (Jarai y Buxton, 1994; Poussereau *et al.* 2001; Billon-Grand *et al.* 2002; Rolland *et al.* 2009). En el hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum* se analizó la regulación de dos genes que codificaban dos proteasas diferentes (*acp1* y *aspS*). Se examinó el efecto de diferentes fuentes de carbono (pectina, glucosa y pared celular de *Phaseolus vulgaris*) y la actividad se incrementó con todas las fuentes de carbono, aunque los mayores niveles se obtuvieron cuando se añadió pectina (Bueno *et al.* 2012). La inducción de la expresión de la proteasa *acp1* de *S. sclerotiorum* por proteínas de la pared celular de plantas está controlada por represión catabólica por carbono y nitrógeno, y, además, por el pH. Esta regulación podría deberse a la presencia de varios motivos de unión en el promotor del gen para reguladores como CreA, AreA y PacC (Poussereau *et al.* 2001; Kim *et al.* 2007). Vautard-Mey y Fevre (2003) demostraron que cuando *S. sclerotiorum* crecía en presencia de glucosa se incrementaba la expresión del represor de glucosa, *cre1*, y como consecuencia, esto podría contribuir a la represión de genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular como las proteasas. Jarai y Buxton (1994), en el estudio de la expresión de dos proteasas ácidas extracelulares de *A. niger* observaron que si en el medio había una fuente de nitrógeno o carbono adecuada ninguno de los dos genes se expresaba. Del mismo modo, bajo un pH alcalino, la expresión de ambos genes también estaba reprimida. El análisis de la región promotora de ambos genes reveló que tenían regiones de unión a reguladores como AreA y CreA. Esta represión catabólica por componentes del medio de cultivo explicaría porqué en los análisis Northern todas las proteasas muestran una expresión diferencial durante la infección y no se expresan en condiciones *in vitro*. Además, sugiere que para un mejor conocimiento de la regulación de estas proteasas debería realizarse un estudio de la región promotora para la búsqueda de posibles sitios de unión de reguladores como PacC.

El análisis de las secuencias de las proteasas obtenidas reveló que todas ellas poseían péptido señal, que eran secretadas al medio extracelular y que deben ser procesadas para obtener su forma madura. Además tres de ellas (PDIP\_82060, PDIP\_12220 y PDIP\_06020) son activas a pH ácido. Todas ellas pertenecen a familias diferentes aunque debido al carácter de su sitio catalítico activo y las condiciones de acción de los unigenes PDIP\_12220, PDIP\_67670 y PDIP\_06020C03 son consideradas como serin proteasas, mientras que PDIP\_82060 es una proteasa aspártica y PDIP\_06020 una proteasa glutámica. Todas estas características son coherentes con el modo de acción de *P. digitatum* en el proceso de infección, ya que acidifica el medio adecuándolo al pH óptimo de sus enzimas, como en este caso las proteasas, que además son liberadas al medio para actuar sobre el fruto.



Debido al elevado número de genes que codifican proteasas que se identificaron en la genoteca substractiva y a los precedentes bibliográficos ya mencionados en los que la eliminación individual de miembros de familias multigénicas no altera el fenotipo de la cepas mutantes resultantes, se decidió no abordar en esta Tesis la obtención de mutantes nulos en genes individuales. Para profundizar en el estudio del papel que tienen estas proteasas en la capacidad infectiva de *P. digitatum* habría que conseguir mutantes múltiples o bien conseguir un mutante en un gen regulador que conlleve la no expresión de este grupo de genes.

**CONCLUSIONES**

---

**1.-** Se han desarrollado las siguientes herramientas moleculares y genómicas necesarias para la identificación y caracterización de genes de *P. digitatum* implicados en patogenicidad/virulencia sobre frutos de naranja: 1) Construcción de una genoteca de DNA genómico de *P. digitatum*. 2) Construcción de una genoteca substractiva de cDNA enriquecida en genes de *P. digitatum* que se inducen durante la infección. 3) Construcción de una macromatriz de cDNA conteniendo 1344 clones de la genoteca substractiva. 4) Desarrollo de un sistema de transformación basado en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. 5) Se ha obtenido una cepa  $\Delta ku80$  deficiente en reparación de extremos no homólogos de DNA que podrá ser utilizada para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga. 6) Se han construido dos vectores para el silenciamiento génico mediado por RNA interferente, uno con el gen de resistencia a higromicina y otro a fleomicina.

**2.-** Se han obtenido transformantes de *P. digitatum* marcados con dos variantes de la proteína verde fluorescente (eGFP y sGFP) que no difieren en morfología, crecimiento y capacidad de infección respecto a la cepa silvestre, por lo que constituyen una herramienta útil para monitorizar los procesos de infección del hongo en frutos cítricos.

**3.-** Los mutantes de expresión constitutiva del factor de transcripción PacC muestran una reducción de la virulencia del 20 % en relación a la cepa silvestre, lo que sugiere que este factor es un regulador negativo de la patogénesis en *P. digitatum*.

**4.-** El análisis Northern llevado a cabo con 19 genes identificados a partir de la genoteca substractiva mostró que todos ellos, excepto el gen *cyp51B*, que codifica una P450 14 alfa-esterol demetilasa, mostraron una expresión diferencial durante el proceso de infección.

**5.-** Entre los genes con un mayor número de ESTs y con diferencias significativas en los niveles de expresión durante la infección que se han identificado en la genoteca PDS se encuentran genes involucrados en la respuesta a estrés y detoxificación, enzimas relacionadas con la pared celular y proteasas, siendo esta última categoría la más representada.

**6.-** Atendiendo a su posible función y su expresión diferencial durante el proceso de infección se han clonado, secuenciado y obtenido mutantes de delección de los genes que codifican la poligalacturonasa 1, poligalacturonasa 2, una pectin liasa y una proteína Rieske. Los mutantes de delección de los tres genes de degradación de la pared mostraron una reducción de la virulencia del 25 % con respecto de la cepa silvestre, indicando que son importantes factores de virulencia de *P. digitatum*. El mutante del gen que codifica la proteína Rieske no varió su virulencia con respecto a la cepa silvestre.





- Abraham, A. O., Laing, M. D. and Bower, J. P.** 2010 "Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus antagonists* for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit", *Biological Control* 53(1): 32-38.
- Abu, S. M., Li, G. and Asiegbu, F. O.** 2004 "Identification of *Heterobasidion annosum* (S-type) genes expressed during initial stages of conidiospore germination and under varying culture conditions", *FEMS Microbiology Letters* 233(2): 205-213.
- Achilea, O., Chalutz, E., Fuchs, Y. and Rot, I.** 1985a "Ethylene biosynthesis and related physiological changes in *Penicillium digitatum*-infected grapefruit (*Citrus paradisi*)", *Physiological Plant Pathology* 26(2): 125-134.
- Achilea, O., Fuchs, Y., Chalutz, E. and Rot, I.** 1985b "The contribution of host and pathogen to ethylene biosynthesis in *Penicillium digitatum*-infected citrus fruit", *Physiological Plant Pathology* 27(1): 55-63.
- Adaskaveg, J. E., Förster, H., and Sommer, N. F.** 2002 "Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops", in A. A. Kader (ed) *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, Oakland, CA, EE UU: University of California, Agriculture and Natural Resources no 3311.
- Adaskaveg, J. E., Kanetis, L., Soto-Estrada, A., and Förster, H.** 2004 "A new era of postharvest decay control in citrus with the simultaneous introduction of three new "reduced-risk" fungicides. " *Proc. Int. Soc. Citric.*
- Agrawal, G. K. and Rakwal, R.** 2006 "Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes", *Mass Spectrometry Reviews* 25(1): 1-53.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. and Mukherjee, S. K.** 2003 "RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications", *MMBR.* 67(4): 657-685.
- Agrios, G. N.** 2007 "Fitopatología", in Limusa (ed), México.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W.** 2005 "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes". *Trends Microbiol* 13: 111-118.
- Ahn, J. H. and Walton, J. D.** 1996 "Chromosomal Organization of TOX2, a Complex Locus Controlling Host-Selective Toxin Biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*", *The Plant Cell Online* 8(5): 887-897.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A. M.** 2012 "Phytoalexins in defense against pathogens", *Trends in Plant Science* 17(2): 73-90.
- Ajiro, N., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., Izumi, Y., Tada, Y. and Akimitsu, K.** 2010 "Role of the Host-Selective ACT-Toxin Synthesis Gene ACTTS2 Encoding an Enoyl-Reductase in Pathogenicity of the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata*", *Phytopathology* 100(2): 120-126.
- Akashi, H., Miyagishi, M., Yokota, T., Watanabe, T., Hino, T., Nishina, K., Kohara, M. and Taira, K.** 2005 "Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA", *Molecular BioSystems* 1(5-6): 382-390.
- Alabouvette, C., Olivain, C. and Steinberg, C.** 2006 "Biological Control of Plant Diseases: The European Situation", *European Journal of Plant Pathology* 114(3): 329-341.
- Alana, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M. D., Dominguez, J. B., Llama, M. J. and Serra, J. L.** 1989 "Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain", *Applied and Environmental Microbiology* 55(6): 1612-1616.
- Alkan, N., Fluhr, R., Sherman, A., and Prusky, D.** 2008 "Role of Ammonia Secretion and pH Modulation on Pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on Tomato Fruit." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(8): 1058-1066.
- Alberola, T. M.** 2004 "A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Features and uses", *International Microbiology* 7(3): 199-206.
- Albersheim, M.** 1973 "Purification of a Protease Secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*", *Phytopathology* 63: 625-629.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Visser, J. and Voragen, A. G. J.** 1996 "An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants" *Progress*

in *Biotechnology*, Vol. Volume 14: Elsevier.

**Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. and Kniemeyer, O.** 2010 "Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*", *BMC Genomics* 11(1): 32.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** 1990 "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., SchÄaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** 1997 "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.

**Ameziane, N., Boubaker, H., Boudyach, H., Msanda, F., Jilal, A. and Benaoumar, A.** 2007 "Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens", *ASD*. 27(3): 273-277.

**Amiri, A. and Bompeix, G.** 2005 "Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development", *Plant Pathology* 54(1): 74-81.

**Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J.-M., Quavillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V. r., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collamare, J. r., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A. I., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Galdener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvaglise, C. c., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Sagurens, B. a., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M.-H. and Dickman, M.** 2011 "Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*", *PLoS Genet* 7(8): e1002230.

**An, H. J., Lurie, S., Greve, L. C., Rosenquist, D., Kirmiz, C., Labavitch, J. M. and Lebrilla, C. B.** 2005 "Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell walls", *Analytical Biochemistry* 338(1): 71-82.

**Anzlovar, S. and Dermastia, M.** 2003 "The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins", *Plant Biology*. 5:116-124.

**Andrade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J. G. M. and Waard, M. A. D.** 2000a "The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds", *Microbiology* 146(8): 1987-1997.

**Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G. M., Peery, R. B., Skatrud, P. L. and De Waard, M. A.** 2000b "The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans*; in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production", *Molecular and General Genetics MGG* 263(6): 966-977.

**Andreini, C., Bertini, I. and Cavallaro, G.** 2011 "Minimal Functional Sites Allow a Classification of Zinc Sites in Proteins", *PLoS ONE* 6(10): e26325.

**Angioni, A., Cabras, P., D'Hallewin, G., Pirisi, F. M., Reniero, F. and Schirra, M.** 1998 "Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in Citrus fruit", *Phytochemistry* 47(8): 1521-1525.

**Annis, S. L. and Goodwin, P. H.** 1997 "Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi", *European Journal of Plant Pathology* 103(1): 1-14.

**Apel, K. and Hirt, H.** 2004 "REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction", *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373-399.

**Apel, P. C., Panaccione, D. G., Holden, F. R., Walton, J. D.** 1993 "Cloning and targeted gene disruption of *XYL1*, a beta 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*", *MPMI* 6: 467-473.

**Apel, P. C. Walton, J. D.** 1996 "Cloning, disruption, and expression of two endo-beta 1, 4-xylanase genes, *XYL2* and *XYL3*, from *Cochliobolus carbonum*" *Appl. Environ. Microbiol* 62: 4129-4135.

**Aro, N., Pakula, T. and PenttilÄ, M.** 2005 "Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous

fungi", *FEMS Microbiology Rev* 29(4): 719-39.

**Arras, G., Fois, M, Molinu, M.G, Venditti, T and Agabbio, M.** 2008 "Biological and integrated control by the yeast *Candida oleophila* of postharvest decay of Tangelo mapo", In: *Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders*. Proceedings of Cost Action 924 International Congress, 66-71

**Asai, S. and Yoshioka, H.** 2009 "Nitric Oxide as a Partner of Reactive Oxygen Species Participates in Disease Resistance to Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(6): 619-629.

**Asch, D. K. and Kinsey, J. A.** 1990 "Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa*; with the cloned (GDH) gene", *Molecular and General Genetics MGG* 221(1): 37-43.

**Asiegbu, F. O., Abu, S., Stenlid, J. and Johansson, M.** 2004 "Sequence polymorphism and molecular characterization of laccase genes of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*", *Mycological Research* 108(02): 136-148.

**Askwith, C. and Kaplan, J.** 1997 "An Oxidase-Permease-based Iron Transport System in *Schizosaccharomyces pombe* and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Biological Chemistry* 272(1): 401-405.

**Askwith, C. C., de Silva, D. and Kaplan, J.** 1996 "Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular Microbiology* 20(1): 27-34.

**Asselbergh, B., Curvers, K., Fransa, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. and Hafte, M.** 2007 "Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutant, Involves Timely Production of Hydrogen Peroxide and Cell Wall Modifications in the Epidermis", *Plant Physiology* 144(4): 1863-1877.

**Auld, D. S. and James F. Riordan, B. L. V.** 1988 "Use of chelating agents to inhibit enzymes" *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 158: Academic Press.

**Bae, Y. S. and Knudsen, G. R.** 2000 "Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta -Glucuronidase and Green Fluorescent Protein Genes Provides a Useful Tool for Monitoring Fungal Growth and Activity in Natural Soils", *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2): 810-815.

**Bailey, A., Mueller, E. and Bowyer, P.** 2000 "Ornithine decarboxylase of *Stagonospora (Septoria) nodorum* is required for virulence toward wheat". *J Biol Chem* 275: 14242-14247.

**Baker, C. J. and Orlandi, E. W.** 1995 "Active Oxygen in Plant Pathogenesis", *Annual Review of Phytopathology* 33(1): 299-321.

**Balhadere, P. V., Foster, A. J. and Talbot, N. J.** 1999 "Identification of pathogenicity mutants in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis". *MPMI* 12: 129-142

**Ball, A. M., Ashby, A. M., Daniels, M. J., Ingram, D. S. and Johnstone, K.** 1991 "Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38(2): 147-161.

**Ballester, A. R., Lafuente, M. T., Gonzalez, C. and L.** 2006 Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction, Vol. 39, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.

**Banks, C. V. and Bystroff, R. I.** 1959 "Stability Orders in Transition Metal-1,10-Phenanthroline Complexes<sup>1</sup>", *Journal of the American Chemical Society* 81(23): 6153-6158.

**Banuett, F. and Herskowitz, I.** 1994 "Identification of fuz7, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle", *Genes & Development* 8(12): 1367-1378.

**Barad, S., Horowitz, S. B., Moskovitch, O., Lichter, A., Sherman, A. and Prusky, D.** 2012 "A *Penicillium expansum* Glucose Oxidase Encoding Gene, *GOX2*, Is Essential for Gluconic Acid Production and Acidification During Colonization of Deciduous Fruit", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(6): 779-788.

**Barash, I.** 1970 "Isolation and properties of an exopolysaccharuronase produced by *Penicillium digitatum* during infection lemon fruits", *Israel Journal Botany* 19: 599-608.



- Barkai-Golan, R., Kahan, R. S. and Padova, R.** 1969 "Synergistic effects of gamma radiation and heat on the development of *Penicillium digitatum* in vitro and in stored citrus fruit", *Phytopathology* 59: 922-924.
- Barkai-Golan, R.** 1992 "Suppression of postharvest pathogens of fresh fruits and vegetables by ionizing radiation", in R. I (ed) *Electromagnetic radiations in fruit science*, Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Barkai-Golan, R. and Karadavid, R.** 1991 "Cellulolytic Activity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* Related to Fungal Growth and to Pathogenesis in Citrus Fruits", *Journal of Phytopathology* 131(1): 65-72.
- Barkai-Golan, R. P., D.J.** 1991 "Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control", *Plant Disease* 75: 1085-1089.
- Barmore, C. R. a. B., G.E.** 1979 "Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruits caused by *Penicillium digitatum*." *Phytopathology* 69: 675-678.
- Barras, F., van Gijsegem, F. and Chatterjee, A. K.** 1994 "Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot Erwinia", *Annual Review of Phytopathology* 32(1): 201-234.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B.** 2002 "The strobilurin fungicides", *Pest Management Science* 58: 649-662.
- Bartoszewska, J. A., Kiel. W. K.** 2011 "The Role of Macroautophagy in Development of Filamentous Fungi", *Antioxidants & Redox Signaling* 14(11): 2271-2287.
- Bateman, D. F. and Beer, S. V.** 1965 "Simultaneous Production and Synergistic Action Of Oxalic Acid And Polygalacturonase During Pathogenesis By *Sclerotium rolfsii*", *Phytopathology* 55(2): 204.
- Bautista, L. F., Aleksenko, A., Hentzer, M., Santerre-Henriksen, A. and Nielsen, J.** 2000 "Antisense Silencing of the *creA* Gene in *Aspergillus nidulans*" *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10): 4579-4581.
- Ben, Y., S, Barak, E and Shapiro, B.** 1987 *Postharvest curing at high temperatures reduces decay of individually sealed lemons, pomelos, and other citrus fruit*, Vol. 112, Alexandria, VA, ETATS-UNIS: American Society for Horticultural Science.
- Benhamou, N.** 2004 "Potential of the Mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to Protect Citrus Fruit Against *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold: A Comparison with the Effect of Chitosan", *Phytopathology* 94(7): 693-705.
- Benhamou, N. and Brodeur, J.** 2000 "Evidence for Antibiosis and Induced Host Defense Reactions in the Interaction Between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold", *Phytopathology* 90(9): 932-943.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y.** 2000 "On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics", *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 25(1): 60-83.
- Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Debuchy, R., Panvier-Adoutte, A., Thompson-Coffe, C. and Picard, M.** 1998 "A homologue of the yeast *SHE4* gene is essential for the transition between the syncytial and cellular stages during sexual reproduction of the fungus *Podospora anserina*", *EMBO J* 17(5): 1248-1258.
- Beyer, K., Jiménez, S. J., Randall, T. A., Lam, S., Binder, A., Boller, T. and Collinge, M. A.** 2002 "Characterization of *Phytophthora infestans* genes regulated during the interaction with potato", *Molecular Plant Pathology* 3(6): 473-485.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y. and King, J.** 2009 "Role of lignification in plant defense", *Plant Signaling & Behavior* 4(2): 158-159.
- Bidochka, M. J., Leger, R. J. S., Stuart, A. and Gowanlock, K.** 1999 "Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases", *Microbiology* 145(4): 955-963.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A., Haynes, K., Arst, H. and Rogers, T.** 2005 "The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence", *Molecular Microbiology* 55(4): 1072.
- Billon-Grand, G., Poussereau, N. and Fèvre, M.** 2002 "The Extracellular Proteases Secreted in vitro and in planta by

the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*", *Journal of Phytopathology* 150(8-9): 507-511.

**Billon-Grand, G., Rasclé, C., Droux, M., Rollins, J. A., Poussereau, N.** 2012 "pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*." *Molecular Plant Pathology* 13(6): 568-578.

**Bindschedler, L. V., Sanchez, P., Dunn, S., Mikan, J., Thangavelu, M., Clarkson, J. M. and Cooper, R. M.** 2003 "Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection", *Fungal Genetics and Biology* 38(1): 43-53.

**Binet, P., Portal, J. M. and Leyval, C.** 2000 "Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass", *Plant and Soil* 227(1): 207-213.

**Bird, D. and Bradshaw, R.** 1997 "Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*", *Molecular and General Genetics MGG* 255(2): 219-225.

**Bittel, P. and Robatzek, S.** 2007 "Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity", *Current Opinion in Plant Biology* 10(4): 335-341.

**Bittner-Eddy, P. D., Allen, R. L., Rehmany, A. P., Birch, P. and Beynon, J. L.** 2003 "Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*", *Molecular Plant Pathology* 4(6): 501-507.

**Blanco, F. A. and Judelson, H. S.** 2005 "A bZIP transcription factor from *Phytophthora* interacts with a protein kinase and is required for zoospore motility and plant infection", *Molecular Microbiology* 56(3): 638-648.

**Bland, J. M. and Altman, D. G.** 1995 "Multiple significance tests: the Bonferroni method", *BMJ* 310(6973): 170.

**Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I. and Fütterer, J.** 1999 "Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease", *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98(6): 1079-1086.

**Bölker, M.** 1998 "Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis", *Fungal Genetics and Biology* 25(3): 143-156.

**Boller, T. and Felix, G.** 2009 "A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors", *Annual Review of Plant Biology* 60(1): 379-406.

**Bolton, M. D., Thomma, B. P., Nelson, B.D.** 2006 "*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen." *Molecular Plant Pathology* 7(1): 1-16.

**Borges-Walmsley, M. I. and Walmsley, A. R.** 2000 "cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity", *Trends in Microbiology* 8(3): 133-141.

**Borg-von Zepelin, M., Meyer, I., Thomssen, R., Wurzner, R., Sanglard, D., Telenti, A. and Monod, M.** 1999 "HIV-Protease Inhibitors Reduce Cell Adherence of *Candida albicans* Strains by Inhibition of Yeast Secreted Aspartic Proteases" 113(5): 747-751.

**Borrás, A. D. and Aguilar, R. V.** 1990 "Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits", *International Journal of Food Microbiology* 11(2): 179-183.

**Both, M., Eckert, S. E., Csukai, M., Müller, E., Dimopoulos, G. and Spanu, P. D.** 2005 "Transcript Profiles of *Blumeria graminis* Development During Infection Reveal a Cluster of Genes That Are Potential Virulence Determinants", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(2): 125-133.

**Bottin, A., Larche, L., Villalba, F., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M. T. and Rickauer, M.** 1999 "Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*", *Fems Microbiology Letters* 176(1): 51-56.

**Bouck, A. M. Y. and Vision, T.** 2007 "The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags", *Molecular Ecology* 16(5): 907-924.

**Bowen, J. K., Templeton, M. D., Sharrock, K. R., Crowhurst, R. N. and Rikkerink, E. H. A.** 1995 "Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata* three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*", *Molecular and General Genetics MGG* 246(2): 196-205.

- Bowman, S. M., Piwowar, A., Ciocca, M. and Free, S. J.** 2005 "Mannosyltransferase is required for cell wall biosynthesis, morphology and control of asexual development in *Neurospora crassa*", *Mycologia* 97(4): 872-879.
- Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L. and Antunes, F.** 2004 "Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Plasma Membrane Permeability during Adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Biological Chemistry* 279(8): 6501-6506.
- Brazeau, B. J., Johnson, B. J. and Wilmot, C. M.** 2004 "Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428(1): 22-31.
- Breakspear, A. and Momany, M.** 2007 "The first fifty microarray studies in filamentous fungi", *Microbiology* 153(1): 7-15.
- Brito, N. I., Espino, J. J. and González, C.** 2006 "The Endo-1,4-Xylanase Xyn11A Is Required for Virulence in *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(1): 25-32.
- Broderick, J. B.** 2001 "Coenzymes and Cofactors" *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Bromley, M., Gordon, C., Rovira-Graells, N. and Oliver, J.** 2006 "The *Aspergillus fumigatus* cellobiohydrolase B (*cbhB*) promoter is tightly regulated and can be exploited for controlled protein expression and RNAi", *Fems Microbiology Letters* 264(2): 246-254.
- Brown, G. E. and Baraka, M.A.** 1996 "Effect of washing sequence and heated solutions to degreened Hamlin oranges on Diplodia stem-end rot, fruit colour and phytotoxicity", *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 1164-1170.
- Brul, S., Stratford, M., Vaart, J. M. v. d., Dielbandhoesing, S., Steels, H., Klis, F. M. and Verrips, C. T.** 1997 "The antifungal action of 1,10-o-phenanthroline and EDTA is mediated through zinc chelation and involves cell wall construction".
- Brunner, P. C., Stefanato, F. L. and McDonald, B. A.** 2008 "Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement", *Molecular Plant Pathology* 9(3): 305-316.
- Bueno, E. A., Oliveira, M. B., Andrade, R. V., Lobo Junior, M., and Petrofeza, S.** 2012 "Effect of different carbon sources on proteases secreted by the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during *Phaseolus vulgaris* infection.", *Genet Mol Res* 11(3): 2171-81.
- Bugos, R. C., Sutherland, J. B. and Adler, J. H.** 1988 "Phenolic Compound Utilization by the Soft Rot Fungus *Lecytophora hoffmannii*", *Applied and Environmental Microbiology* 54(7): 1882-1885.
- Bus, V. G., Bongers, A. J., Risse and L, A.** 1991 Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins, Vol. 75, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.
- Bush, D. A. and Codner, R. C.** 1968 "The mature of macerating factor of *Penicillium digitatum* saccardo" *Phytochemistry* 7: 863-869.
- Bushong, P. M. and Timmer, L. W.** 2000 "Evaluation of Postinfection Control of Citrus Scab and Melanose with Benomyl, Fenbuconazole, and Azoxystrobin", *Plant Disease* 84(11): 1246-1249.
- Bussink, H. J. D., Kester, H. C. M. and Visser, J.** 1990 "Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase of *Aspergillus niger*", *FEBS Letters* 273(12): 127-130.
- Butler, H. M., Hurse, A., Thursky, E. and Shulman, A.** 1969 "Bactericidal Action Of Selected Phenanthroline Chelates And Related Compounds", *Aust J Exp Biol Med* 47(5): 541-552.
- Calvente, V., Benuzzi, D. and de Tosetti, M. I. S.** 1999 "Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*", *International Biodeterioration & Biodegradation* 43(4): 167-172.
- Camargo, A., Llamas, Á. n., Schnell, R. A., Higuera, J. J., González-Ballester, D., Lefebvre, P. A., Fernández, E. and Galvan, A.** 2007 "Nitrate Signaling by the Regulatory Gene NIT2 in *Chlamydomonas*", *The Plant Cell Online* 19(11): 3491-3503.

- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abián, J. and San Segundo, B.** 2004 "The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach", *PROTEOMICS* 4(2): 383-396.
- Cao, J. and Jiang, W.** 2006 "Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth", *Scientia Horticulturae* 110(2): 181-186.
- Cao, M., Koulman, A., Johnson, L. J., Lane, G. A. and Rasmussen, S.** 2008 "Advanced Data-Mining Strategies for the Analysis of Direct-Infusion Ion Trap Mass Spectrometry Data from the Association of Perennial Ryegrass with Its Endophytic Fungus, *Neotyphodium lolii*", *Plant Physiology* 146(4): 1501-1514.
- Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M. I. G., Di Pietro, A. and Ramos, J.** 2003 "pH Response Transcription Factor PacC Controls Salt Stress Tolerance and Expression of the P-Type Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*", *Eukaryotic Cell* 2(6): 1246-1252.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I. and Di Pietro, A.** 2003 "The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*", *Molecular Microbiology* 48(3): 765-779.
- Carlile, A. J., Bindschedler, L. V., Bailey, A. M., Bowyer, P., Clarkson, J. M. and Cooper, R. M.** 2000 "Characterization of SNP1, a Cell Wall-Degrading Trypsin, Produced During Infection by *Stagonospora nodorum*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(5): 538-550.
- Cassab, G. I.** 1998 "Plant cell wall proteins", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49(1): 281-309.
- Castoria, R., Caputo, L., De Curtis, F. and De Cicco, V.** 2003 "Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action", *Phytopathology* 93(5): 564-572.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S. and De Cicco, V.** 2001 "*Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action", *Postharvest Biology and Technology* 22(1): 7-17.
- Catanzariti, A. and Jones, D. A.** 2010 "Effector proteins of extracellular fungal plant pathogens that trigger host resistance", *Functional Plant Biology* 37(10): 901-906.
- Cavin, J. F., Barthelmebs, L. and Divias, C.** 1997 "Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization", *Applied and Environmental Microbiology* 63(5): 1939-44.
- Celenza, J. L. and Carlson, M.** 1986 "A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase", *Science* 233(4769): 1175-1180.
- Cerniglia, C. E.** 1992 "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Biodegradation* 3(2): 351-368.
- Cervantes, C. and Gutierrez-Corona, F.** 1994 "Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi", *FEMS Microbiology Reviews* 14(2): 121-137.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B. and Low, P. S.** 2000 "Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant", *The Plant Cell Online* 12(11): 2191-2200.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** 1994 "Green fluorescent protein as a marker for gene expression", *Science* 263(5148): 802-805.
- Chandrakant, S. K. and Shwetha, S. R.** 2011 "Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review", *Enzyme Research* 2011: 11.
- Chang, H.-K., Mohseni, P. and Zylstra, G. J.** 2003 "Characterization and Regulation of the Genes for a Novel Anthranilate 1,2-Dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DBO1", *Journal of Bacteriology* 185(19): 5871-5881.
- Chang, P. K.** 2008 "A highly efficient gene-targeting system for *Aspergillus parasiticus*", *Letters in Applied Microbiology* 46(5): 587-592.
- Chen, H. J. Hsieh, T.C. and Tseng, C.** 1998 "Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium*

*splendens* infected cucumber fruits”, *Bot. Bull. Acad. Sin* 39: 181-186.

**Chen, R. E. and Thorner, J.** 2007 “Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773(8): 1311-1340

**Chen, Z. Y., Brown, R. L., Lax, A. R., Cleveland, T. E. and Russin, J. S.** 1999 “Inhibition of Plant-Pathogenic Fungi by a Corn Trypsin Inhibitor Overexpressed in *Escherichia coli*”, *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1320-1324.

**Chet, I., Inbar, J., and Hadar, Y.** 1997 “Fungal antagonists and mycoparasites.”, in E. D. T. Wicklow and B. Soderstrom (ed) *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*, Berlin-Heidelberg.

**Chevalet, L., Tiraby, G. r., Cabane, B. and Loison, G. r.** 1992 “Transformation of *Aspergillus flavus* construction of urate oxidase-deficient mutants by gene disruption”, *Current Genetics* 21(6): 447-453.

**Chi, M. H., Park, S. Y., Kim, S. and Lee, Y. H.** 2009 “A Novel Pathogenicity Gene Is Required in the Rice Blast Fungus to Suppress the Basal Defenses of the Host”, *PLoS Pathog* 5(4): e1000401.

**Chien, P. J., Sheu, F. and Lin, H. R.** 2007 “Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life”, *Food Chemistry* 100(3): 1160-1164.

**Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G.** 2006 “The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception”, *The Plant Cell Online* 18(2): 465-476.

**Cho, Y., Cramer Jr, R. A., Kim, K.-H., Davis, J., Mitchell, T. K., Figuli, P., Pryor, B. M., Lemasters, E. and Lawrence, C. B.** 2007 “The Fus3/Kss1 MAP kinase homolog Amk1 regulates the expression of genes encoding hydrolytic enzymes in *Alternaria brassicicola*”, *Fungal Genetics and Biology* 44(6): 543-553.

**Choi, G. H., Pawlyk, D. M., Rae, B., Shapira, R. and Nuss, D. L.** 1993 “Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*”, *Gene* 125(2): 135-141.

**Church, G. M. and Gilbert, W.** 1984 “Genomic sequencing”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(7): 1991-1995.

**Clark, S. J., Templeton, M. D. and Sullivan, P. A.** 1997 “A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA”, *Microbiology* 143(4): 1395-1403.

**Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H. P. and Krajinski, F.** 2004 “Proteomic approach: Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*”, *Plant Molecular Biology* 55(1): 109-120.

**Coleman, J. E.** 1992 “Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins”, *Annual Review of Biochemistry* 61(1): 897-946.

**Collado, I. G., Sanchez, A. J. M. and Hanson, J. R.** 2007 “Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*”, *Natural Product Reports* 24(4): 674-686.

**Collet, J. F. and Messens, J.** 2010 “Antioxidants & Redox Signaling” 13(8): 1205-1216.

**Collinge, D. B., Madriz-Orde A. K. and Newman, M. A.** 2001 “The responses of plants to pathogens”, *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*: 131-158.

**Collmer, A. and Keen, N. T.** 1986 “The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis”, *Annual Review of Phytopathology* 24(1): 383-409.

**Combier, J. P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G. and Marmeisse, R.** 2003 “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*”, *FEMS Microbiology Letters* 220(1): 141-148.

**Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. and Tavladoraki, P.** 2006 “Functions of amine oxidases in plant development and defence”, *Trends in Plant Science* 11(2): 80-88.

**Cormack, B.** 1998 “Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi”, *Current Opinion in Microbiology* 1(4): 406-410.

- Cosgrove, D. J.** 2000 "Expansive growth of plant cell walls", *Plant Physiology and Biochemistry* 38(2): 109-124.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C. and Fèvre, M.** 2003 "Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*", *Fems Microbiology Letters* 227(2): 163-169.
- Coyle, B., Kavanagh, K., McCann, M., Devereux, M. and Geraghty, M.** 2003 "Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes", *BioMetals* 16(2): 321-329.
- Cramer, R. A. and Lawrence, C. B.** 2004 "Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*", *Fungal Genetics and Biology* 41(2): 115-128.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J.** 2006. "Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response". *Cell* 124, 803 -814
- Critchlow, S. E. and Jackson, S. P.** 1998 "DNA end-joining: from yeast to man", *Trends in Biochemical Sciences* 23(10): 394-398.
- Cruz, M. C., Cavallo, L. M., GÄ¶rlach, J. M., Cox, G., Perfect, J. R., Cardenas, M. E. and Heitman, J.** 1999 "Rapamycin Antifungal Action Is Mediated via Conserved Complexes with FKBP12 and TOR Kinase Homologs in *Cryptococcus neoformans*", *Molecular and Cellular Biology* 19(6): 4101-4112.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. and Tsien, R. Y.** 1995 "Understanding, improving and using green fluorescent proteins", *Trends in Biochemical Sciences* 20(11): 448-455.
- Cuomo, C. A., Galdener, 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., Antoniwi, 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., Mansterketter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Ouellet, T. r. s., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M. I. G., Seong, K.-Y., Tetko, I. V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T. J., Yao, J., Birren, B. W. and Kistler, H. C.** 2007 "The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization", *Science* 317(5843): 1400-1402.
- Curtis, M. J. and Wolpert, T. J.** 2004 "The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity", *The Plant Journal* 38(2): 244-259.
- Cutler, N. S., Heitman, J. and Cardenas, M. E.** 1999 "TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals", *Molecular and Cellular Endocrinology* 155(2): 135-142.
- D'hallewin, G., Arras, G., Castia, T and Piga, A.** 1994 "Reducing decay of 'Avena' mandarin fruit by the use of UV, heat and thiabendazole treatments.", *Acta Horticulturae* 368: 387-394.
- D'hallewin, G., Arras, G., Dessi, R, Dettori, A and Schirra, M.** 1999 "Citrus green mould control in stored "Star Ruby" grapefruits by the use of a biocontrol yeast under curing conditions", *Acta Horticulturae* 485: 111-115.
- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D. and Wilson, T. E.** 2005 "Nonhomologous end joining in yeast", *Annual Review of Genetics* 39(1): 431-451.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G.** 2001 "Plant pathogens and integrated defence responses to infection", *Nature* 411(6839): 826-833.
- Danson, J., Wasano, K. and Nose, A.** 2000 "Infection of Rice Plants with the Sheath Blight Fungus Causes an Activation of Pentose Phosphate and Glycolytic Pathways", *European Journal of Plant Pathology* 106(6): 555-561.
- Darrenberger, F., Wong, K. and Kronstad, J. W.** 1998 "Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(10): 5684-5689.
- Datson, N. A., van der Perk-de Jong, J., van den Berg, M. P., de Kloet, E. R. and Vreugdenhil, E.** 1999 "MicroSAGE: A modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue", *Nucleic Acids Research* 27(5): 1300-1307.
- Davidse, L. G.** 1986 "Benzimidazole fungicides mechanism of action and biological impact", *Annual Review of*

*Phytopathology*: 24-43.

**Dawe, A. L. and Nuss, D. L.** 2001 "HYPOVIRUSES AND CHESTNUT BLIGHT: Exploiting Viruses to Understand and Modulate Fungal Pathogenesis", *Annual Review of Genetics* 35(1): 1-29.

**de Boer, M., van der Sluis, I., van Loon, L. and Bakker, P. H. M.** 1999 "Combining Fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains to Enhance Suppression of *Fusarium* Wilt of Radish", *European Journal of Plant Pathology* 105(2): 201-210.

**De Bernardis, F., Mühlischlegel, F. A., Cassone, A. Fonzi, W. A.** 1998 "The pH of the Host Niche Controls Gene Expression in and Virulence of *Candida albicans*." *Infection and Immunity* 66(7): 3317-3325.

**de Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M.** 1998 "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi", *Nat Biotech* 16(9): 839-842.

**de Jong, J. F., Deelstra, H. J., Wosten, H. A. B. and Lugones, L. G.** 2006 "RNA-Mediated Gene Silencing in Monokaryons and Dikaryons of *Schizophyllum commune*", *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2): 1267-1269.

**De Lacy Costello, B. P. J., Evans, P., Ewen, R. J., Gunson, H. E., Jones, P. R. H., Ratcliffe, N. M. and Spencer-Phillips, P. T. N.** 2001 "Gas chromatography-mass spectrometry analyses of volatile organic compounds from potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans* or *Fusarium coeruleum*", *Plant Pathology* 50(4): 489-496.

**De Lorenzo, G., D'Ovidio, R. and Cervone, F.** 2001 "The role of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIPS) in defense against pathogenic fungi", *Annual Review of Phytopathology* 39(1): 313-335.

**De Lorenzo, G. and Ferrari, S.** 2002 "Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi", *Current Opinion in Plant Biology* 5(4): 295-299.

**de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G., Miranda-Salcedo, M. and Peña-Cabriales, J.** 2012 "*Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(8): 2615-2623.

**de Vries, R. P. and Visser, J.** 2001 "*Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(4): 497-522.

**de Waard, M. A.** 1997 "Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance", *Pesticide Science* 51(3): 271-275.

**de Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H.-j., Stergiopoulos, I. and Zwiers, L.-H.** 2006 "Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence", *Pest Management Science* 62(3): 195-207.

**De Wit, P. J. M.** 1992 "Molecular Characterization of Gene-For-Gene Systems in Plant-Fungus Interactions and the Application of Avirulence Genes in Control of Plant Pathogens", *Annual Review of Phytopathology* 30: 391-418.

**Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E. and Birren, B. W.** 2005 "The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*", *Nature* 434(7036): 980-986.

**Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. J. and De Waard, M. A.** 2000 "Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides", *Fungal Genetics and Biology* 30(1): 1-15.

**Deng, F., Allen, T. D. and Nuss, D. L.** 2007 "Ste12 Transcription Factor Homologue CpST12 Is Down-Regulated by Hypovirus Infection and Required for Virulence and Female Fertility of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica*", *Eukaryotic Cell* 6(2): 235-244.

**Dennis, C.** 1983 "Post-Harvest pathology of fruits and vegetables", *Academi Press, London. UK*: 264.

**DeYoung, B. J. and Innes, R. W.** 2006 "Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense", *Nat Immunology* 7(12): 1243-1249.

**Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Méglecz, E. and Roncero, M. I. G.** 2001 "A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis", *Molecular Microbiology* 39(5): 1140-1152.

- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D.** 1996 "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(12): 6025-6030.
- Diéguez-Uribeondo, J., H. Förster, J. H. and Adaskaveg, J. E.** 2008. "Visualization of Localized Pathogen-Induced pH Modulation in Almond Tissues Infected by *Colletotrichum acutatum* Using Confocal Scanning Laser Microscopy." *Phytopathology* 98(11): 1171-1178.
- Dickman, M. B. and Mitra, A.** 1992 "*Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41(4): 255-263.
- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachatm, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R. A., Flavier, A., Gaffney, T. D., Philippsen, P.** 2004 "The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome", *Science* 304(5668): 304-307.
- DiGiustini, S., Wang, Y., Liao, N. Y., Taylor, G., Tanguay, P., Feau, N., Henrissat, B., Chan, S. K., Hesse-Orce, U., Alamouti, S. M., Tsui, C. K. M., Docking, R. T., Lévasseur, A., Haridas, S., Robertson, G., Birol, I., Holt, R. A., Marra, M. A., Hamelin, R. C., Hirst, M., Jones, S. J. M., Bohlmann, J. r. and Breuil, C.** 2011 "Genome and transcriptome analyses of the mountain pine beetle-fungal symbiont *Grosmannia clavigera*, a lodgepole pine pathogen", *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Divon, H. H. and Fluhr, R.** 2007 "Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants", *Fems Microbiology Letters* 266(1): 65-74.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L.** 1995 "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism", *The Plant Cell Online* 7(7): 1085-1097.
- Dixon, K. P., Xu, J.-R., Smirnov, N. and Talbot, N. J.** 1999 "Independent Signaling Pathways Regulate Cellular Turgor during Hyperosmotic Stress and Appressorium-Mediated Plant Infection by *Magnaporthe grisea*", *The Plant Cell Online* 11(10): 2045-2058.
- Dobinson, K., Grant, S. and Kang, S.** 2004 "Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*", *Current Genetics* 45(2): 104-110.
- Dobinson, K. F., Lecomte, N. and Lazarovits, G.** 1997 "Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*", *Canadian Journal of Microbiology* 43(3): 227-233.
- Doehlemann, G., Berndt, P. and Hahn, M.** 2006 "Different signalling pathways involving a G $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia", *Molecular Microbiology* 59(3): 821-835.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., Kahmann, R.** 2009 "Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells." *PLoS Pathogens* 5(2). e1000290. doi:10.1371/journal.ppat.1000290
- Dong, X.** 1995 "Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(16): 7137-7139.
- Donofrio, N. M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D. E., Jeong, J. S., Coughlan, S., Mitchell, T. K. and Dean, R. A.** 2006 "Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*", *Fungal Genetics and Biology* 43(9): 605-617.
- Doonan, J. H.** 1992 "Cell division in *Aspergillus*", *Journal of Cell Science* 103(3): 599-611.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. and Bellincampi, D.** 2004 "Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in planta pathogen interactions", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Proteomics* 1696(2): 237-244.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C. L. and Wisniewski, M.** 1993 "Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*", *Plant Pathology* 42(3): 418-424.



- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. and Wisniewski, M.** 1992 "Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides", *Phytoparasitica* 20(0): S149-S153.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M. and Shachnai, A.** 1998 "Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus", *Biological Control* 12(2): 97-101.
- Droby, S., Eick, A., Macarasin, D., Cohen, L., Rafael, G., Stange, R., McColum, G., Dudai, N., Nasser, A., Wisniewski, M. and Shapira, R.** 2008 "Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*", *Postharvest Biology and Technology* 49(3): 386-396.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S. and Meir, S.** 1999 "Suppressing Green Mold Decay in Grapefruit with Postharvest Jasmonate Application", *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124(2): 184-188.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. and Porat, R.** 2002 "Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*", *Phytopathology* 92(4): 393-399.
- Droby, S. and Chalutz, E.** 1994 "Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases", *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*: 63-75.
- Drysdale, C. M., Dueñas, E., Jackson, B. M., Reusser, U., Braus, G. H. and Hinnebusch, A. G.** 1995 "The transcriptional activator GCN4 contains multiple activation domains that are critically dependent on hydrophobic amino acids", *Molecular and Cellular Biology* 15(3): 1220-33.
- Du, W., Huang, Z., Flaherty, J. E., Wells, K. and Payne, G. A.** 1999 "Green Fluorescent Protein as a Reporter To Monitor Gene Expression and Food Colonization by *Aspergillus flavus*", *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 834-836.
- Duarte, M. and Videira, A.** 2009 "Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*", *Molecular Microbiology* 72(1): 246-258.
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. and Sainsard-Chanet, A.** 2000 "A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(8): 4138-4143.
- Dumas, B., Centis, S., Sarrazin, N. and Esquerre-Tugaye, M. T.** 1999 "Use of Green Fluorescent Protein To Detect Expression of an Endopolygalacturonase Gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during Bean Infection", *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1769-1771.
- Dunn, W. B. and Ellis, D. I.** 2005 "Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24(4): 285-294
- Dunn, M. F., Ramírez-Trujillo, J. A. and Hernández-Lucas, I.** 2009 "Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis", *Microbiology* 155(10): 3166-3175.
- Duplessis, S. b., Cuomo, C. A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S. p., Amselem, J. I., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kaes, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouz, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J. and Martin, F.** 2011 "Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi", *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Dürrenberger, F., Wong, K. and Kronstad, J. W.** 1998 "Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(10): 5684-5689.
- Dutton, M. V. and Evans, C. S.** 1996 "Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment", *Canadian Journal of Microbiology* 42(9): 881-895.
- Dwyer, F. P., Reid, I.K., Shulman, A., Laycock, G.M. and Dixon, S.** 1969 "The biological actions of 1,10-phenanthroline and 2,20-bipyridine hydrochlorides, quaternary salts and metal chelates and related compounds",

*Australian Journal of Experimental and Biological Medical Science* 47: 203-218.

**Eckert, J. W., Sievert, J. R., Ratnayake and M** 1994 Reduction Of Imazalil Effectiveness Against Citrus Green Mold In California Packinghouses By Resistant Biotypes Of *Penicillium digitatum*, Vol. 78, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.

**Eckert, J. W. and Eaks, I. L.** 1989 "Postharvest disorders and diseases of citrus fruits", in U. o. C. Press (ed) *The Citrus Industry*, Vol. 5, Berkeley, CA, EE UU.

**Eckert, J.W. and Wild, L.** 1982 "Synergy between a benzimidazole-sensitive isolate and benzimidazole isolates of *Penicillium digitatum*", *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 72: 1329-1332.

**Eckert, J. W.** 1978 "Pathological Diseases Of Fresh Fruits And Vegetables", *Journal of Food Biochemistry* 2(3): 243-250.

**Eckert, J. W. and Brown, G. E.** 1986 "Postharvest diseases and their control. In: Fresh Citrus Fruits", *W.F Wardowski, S. Nagy, and W. Grierson (eds) AVI Pub. Co.:* 315-360.

**Eckert, J. W. and Ratnayake, M.** 1994 "Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia", *Phytopathology* 84: 746-750.

**Egan, M. J., Wang, Z. Y., Jones, M. A., Smirnoff, N., and Talbot, N. J.** 2007 "Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease". *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11772-11777

**Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kamper, J. r., Miller, P. and Kahmann, R.** 2006 "A Ferroxidation/Permeation Iron Uptake System Is Required for Virulence in *Ustilago maydis*", *The Plant Cell Online* 18(11): 3332-3345.

**Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P. and Haas, H.** 2004 "Biosynthesis and Uptake of Siderophores Is Controlled by the PacC-Mediated Ambient-pH Regulatory System in *Aspergillus nidulans*", *Eukaryotic Cell* 3(2): 561-563.

**El-Bebany, A. F., Rampitsch, C. and Daayf, F.** 2010 "Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness", *PROTEOMICS* 10(2): 289-303.

**El-Ghaouth, A.** 1997 "Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases", *Journal of Industrial Microbiolog and Biotechnology* 19(3): 160-162.

**El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A. and Wilson, C. L.** 2001 "Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose", *Biological control: theory and applications in pest management* 20(2): 96-101.

**El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M. and Wilson, C. L.** 2000 "Application of *Candida saitoana* and Glycolchitosan for the Control of Postharvest Diseases of Apple and Citrus Fruit Under Semi-Commercial Conditions", *Plant Disease* 84(3): 243-248.

**El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L. and Wilson, C. L.** 2000 "Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit", *Postharvest Biology and Technology* 19(1): 103-110.

**Enkerli, J. R., Felix, G. and Boller, T.** 1999 "The Enzymatic Activity of Fungal Xylanase Is Not Necessary for Its Elicitor Activity", *Plant Physiology* 121(2): 391-398.

**Errampalli, D.** 2004 "Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala", *Crop Protection* 23(9): 811-817.

**Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinoor, A. and Prusky, D.** 2002 "pH Regulates Endoglucanase Expression and Virulence of *Alternaria alternata* in Persimmon Fruit", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(8): 774-779.

**Esposito, E. A. and Peñalva, M. A.** 1996 "Three Binding Sites for the *Aspergillus nidulans* PacC Zinc-finger Transcription Factor Are Necessary and Sufficient for Regulation by Ambient pH of the Isopenicillin N Synthase Gene Promoter", *Journal of Biological Chemistry* 271(46): 28825-28830.

- Espino, J. J., Brito, N., Noda, J. and González, C.** 2005 "Botrytis cinerea endo-beta-1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66(6): 213-221.
- Esser, K., Lüttge, U., Beyschlag, W., Murata, J., Müller, D. and Stahl, U.** 2005 "Recombination: RNA — A Powerful Tool for Recombination and Regulated Expression of Genes" *Progress in Botany*, Vol. 66: Springer Berlin Heidelberg.
- Fallon, K., Bausch, K., Noonan, J., Huguenel, E. and Tamburini, P.** 1997 "Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice", *Infect. Immun.* 65(2): 551-556.
- Farster, H., Driever, G. F., Thompson, D. C. and Adaskaveg, J. E.** 2007 "Postharvest Decay Management for Stone Fruit Crops in California Using the Reduced-Risk Fungicides Fludioxonil and Fenhexamid", *Plant Disease* 91(2): 209-215.
- Feeney, R. E., Petersen, I. M. and Sahinkaya, H.** 1957 "Rings of growth and inhibition of bacteria in agar caused by metal ions and chelating agents", *Journal of Bacteriology* 73(2): 284-290.
- Feng, J., Bussi re, F. and Hekimi, S.** 2001 "Mitochondrial Electron Transport Is a Key Determinant of Life Span in *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Cell.* 1(5): 633-644.
- Fernández Ortu o, D., Torres, J. A., Vicente Moreno, A. d. and Pérez García, A.** 2008 "Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi": Sociedad Española de Microbiolog a.
- Fernández- balos, J. M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B. and Doonan, J. H.** 1998 "Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*", *Molecular Microbiology* 27(1): 121-130.
- Fernández-Acero, F. J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carb , M., Camafeita, E., López, J. A., Cantoral, J. M. and Jorr n, J.** 2006 "Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*", *PROTEOMICS* 6(S1): S88-S96.
- Fernández-Acero, F. J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carba, M., Camafeita, E., Garrido, C., López, J., Jorr n, J. and Cantoral, J. M.** 2007 "Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research", *Archives of Microbiology* 187(3): 207-215.
- Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carb , M., Wieneke, U., Cantoral, J. M. and Schmidt, J.** 2010 "2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors", *PROTEOMICS* 10(12): 2270-2280.
- Fernández-Avarez, A., Elias-Villalobos, A. and Ibeas, J. I.** 2009 "The O-Mannosyltransferase PMT4 Is Essential for Normal Appressorium Formation and Penetration in *Ustilago maydis*", *The Plant Cell Online* 21(10): 3397-3412.
- Fernández-Martín, R., Cerd -Olmedo, E. and Avalos, J.** 2000 "Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*", *Molecular and General Genetics MGG* 263(5): 838-845.
- Ferraro, D. J., Gakhar, L. and Ramaswamy, S.** 2005 "Rieske business: Structure function of Rieske non-heme oxygenases", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1): 175-190.
- Ferreira, M. R. E. d. S., Heinekamp, T., H rtl, A., Brakhage, A. A., Semighini, C. P., Harris, S. D., Savoldi, M., de Gouv a, P. F., Goldman, M. H. d. S. and Goldman, G. H.** 2007 "Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin", *Fungal Genetics and Biology* 44(3): 219-230.
- Fincham, J. R.** 1989 "Transformation in fungi", *MMRV.* 53(1): 148-170.
- Fischer, M. J. C., Farine, S., Chong, J., Guerlain, P. and Bertsch, C.** 2009 "The direct toxicity of BABA against grapevine ecosystem organisms", *Crop Protection* 28(8): 710-712.
- Fitzgerald, A., van Kan, J. A. L. and Plummer, K. M.** 2004 "Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats", *Fungal Genetics and Biology* 41(10): 963-971.
- Fitzgerald, A. M., Mudge, A. M., Gleave, A. P. and Plummer, K. M.** 2003 "*Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*", *Mycological Research* 107(7): 803-810.

- Flaherty, J. E., Pirttila, A. M., Bluhm, B. H. and Woloshuk, C. P.** 2003 "PAC1, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*", *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5222-5227.
- Feilner, A., Sopalla, C. and Weltring, K. M.** 2002 "An ATP-binding Cassette Multidrug-Resistance Transporter Is Necessary for Tolerance of *Gibberella pulicaris* to Phytoalexins and Virulence on Potato Tubers", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(2): 102-108.
- Flor, H. H.** 1971 "Current Status of the Gene-For-Gene Concept", *Annual Review of Phytopathology* 9(1): 275-296.
- Fontana, R., Salvador, S. and Silveira, M.** 2005 "Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32(8): 371-377.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltran, J. P., Berbel, A., Blazquez, M. A., Brumos, J., Canas, L. A., Cercos, M., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Estables, B., Gandia, M., Garcia-Martinez, J. L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., Gonzalez-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M. T., Madueno, F., Marcos, J. F., Marques, M. C., Martinez, F., Martinez-Godoy, M. A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallas, V., Perez-Amador, M. A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodriguez, P. L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talon, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, Ch., Zacarias, L., Conejero, V.** 2005 "Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies." *Plant Molecular Biology* 57(3): 375-391.
- Frandsen, R.** 2011 "A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation", *Journal of Microbiological Methods* 87(3): 247-262.
- Frandsen, R., Andersson, J., Kristensen, M. and Giese, H.** 2008 "Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi", *BMC Molecular Biology* 9(1): 70.
- French, R. C., Long, R. K., Latterell, F. M., Graham, C. L., Smoot, J. J and Shaw, P. E.** 1977 "Effect of Nonanal, Citral, and Citrus Oils on Germination of Conidia of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*", *Phytopathology* 68: 877-882.
- Friesen, T., Meinhardt, S. W. and Faris, J.** 2007 "The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner." *The Plant Journal* 51(4): 681-692.
- Friesen, T., Faris, J., Justin J. D. Solomon, P. S. and Oliver, R. P.** 2008 "Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity." *Cellular Microbiology* 10(7): 1421-1428.
- Friesen, T., Chu, C. G., Liu, Z., Xu, S., Halley, S. and Faris, J.** 2009 "Host-selective toxins produced by *Stagonospora nodorum* confer disease susceptibility in adult wheat plants under field conditions", *TAG Theoretical and Applied Genetics* 118(8): 1489-1497.
- Fry, S. C.** 1986 "Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms", *Annual Review of Plant Physiology* 37(1): 165-186.
- Gabler, F. M., Smilanick, J. L., Mansour, M. F. and Karaca, H.** 2010 "Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes", *Postharvest Biology and Technology* 55(2): 85-90.
- Gadd, G. M. and Griffiths, A. J.** 1977 "Microorganisms and heavy metal toxicity", *Microbial Ecology* 4(4): 303-317.
- Gadd, G. M. and Poole, R. K.** 1999 "Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes" *Advances in Microbial Physiology*, Vol. Volume 41: Academic Press.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P. C., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C. and Birren, B.** 2003 "The genome sequence of

the filamentous fungus *Neurospora crassa*", *Nature* 422(6934): 859-868.

**Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F. and Xi, Y.** 2008 "Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover", *Bioresource Technology* 99(16): 7623-7629.

**Gao, S., Choi, G. H., Shain, L. and Nuss, D. L.** 1996 "Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*", *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 1984-90.

**Gao, S. and Nuss, D. L.** 1996 "Distinct roles for two G protein gamma subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(24): 14122-14127.

**García, S., Prado, M., Dagano, R. and Domínguez, A.** 2002 "A Copper-responsive Transcription Factor, CRF1, Mediates Copper and Cadmium Resistance in *Yarrowia lipolytica*", *Journal of Biological Chemistry* 277(40): 37359-37368.

**Garlach, J. M., Van Der Knaap, E. and Walton, J. D.** 1998 "Cloning and Targeted Disruption of *MLG1*, a Gene Encoding Two of Three Extracellular Mixed-Linked Glucanases of *Cochliobolus carbonum*", *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 385-391.

**Garre, V., Miller, U. and Tudzynski, P.** 1998 "Cloning, Characterization, and Targeted Disruption of *cpcat1*, Coding for an in Planta Secreted Catalase of *Claviceps purpurea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(8): 772-783.

**Gattás, E., Bueno, M. and Ribeiro, M.** 2009 "Stimulation of polygalacturonase production in an immobilized system by *Aspergillus* sp.: effect of pectin and glucose", *European Food Research and Technology* 229(6): 923-928.

**Gemmill, T. R. and Trimble, R. B.** 1999 "Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1426(2): 227-237.

**Geraghty, M., Cronin, J.F., Devereux, M. and McCann, M.,** 1998 "Activity of Copper(II) and Manganese(II) Carboxylate Complexes: X-Ray Crystal Structures of [Cu(sal)(bipy)].C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH.H<sub>2</sub>O and [Cu(norb)(phen)<sub>2</sub>].6.5H<sub>2</sub>O (salH<sub>2</sub>=salicylic acid; norbH<sub>2</sub>=cis-5-norbornene-endo-2,3-dicarboxylic acid; bipy=2,20-bipyridine; phen=1,10-phenanthroline).", *Polyhedron* 18: 2931-2939.

**Geraghty, M., Cronin, J. F., Devereux, M. and McCann, M.** 2000 "Synthesis and antimicrobial activity of copper (II) and manganese(II)  $\alpha,\omega$ -dicarboxylate complexes", *BioMetals* 13(1): 1-8.

**Geraghty, M., Sheridan, V., McCann, M., Devereux, M. and McKee, V.** 1999 "Synthesis and anti-*Candida* activity of copper(II) and manganese(II) carboxylate complexes: X-ray crystal structures of [Cu(sal)(bipy)].C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH.H<sub>2</sub>O and [Cu(norb)(phen)<sub>2</sub>].6.5H<sub>2</sub>O (salH<sub>2</sub>=salicylic acid; norbH<sub>2</sub>=cis-5-norbornene-endo-2,3-dicarboxylic acid; bipy=2,2-bipyridine; phen=1,10-phenanthroline)", *Polyhedron* 18(22): 2931-2939.

**Ghosh, M., Ganguli, A. and Mallik, M.** 2006 "Evidence of indigenous NAH plasmid of naphthalene degrading *Pseudomonas putida* PpG7 strain implicated in limonin degradation", *J Microbiol* 44(5): 473-479.

**Giesbert, S., Schürg, T., Scheele, S. and Tudzynski, P.** 2008 "The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*." *Molecular Plant Pathology* 9(3): 317-327

**Gil, C.** 2003 "La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función", *Actualidad SEM* 35: 12-20.

**Glazebrook, J.** 2005 "Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens", *Annual Review of Phytopathology* 43(1): 205-227.

**Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B. and Dam, R.** 1990 "Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37(3): 179-191.

**Gold, S. E., Duick, J. W., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., George, G. K. and Dilip, K. A.** 2001 "Molecular transformation, gene cloning, and gene expression systems for filamentous fungi" *Applied Mycology and Biotechnology*, Vol. 1: Pages 199-238.

**Goldoni, M., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C.** 2004 "Efficient gene silencing by expression of double stranded

RNA in *Neurospora crassa*", *Fungal Genetics and Biology* 41(11): 1016-1024.

**Gómez-Gómez, E., Ruíz-Roldán, M. C., Di Pietro, A., Roncero, M. I. G. and Hera, C.** 2002 "Role in Pathogenesis of Two Endo-[beta]-1,4-xylanase Genes from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*", *Fungal Genetics and Biology* 35(3): 213-222.

**González-Candelas, L., Alamar, S., Sánchez-Torres, P., Zacarias, L. and Marcos, J.** 2010 "A transcriptomic approach highlights induction of secondary metabolism in citrus fruit in response to *Penicillium digitatum* infection." *BMC Plant Biology* 10(1): 194.

**González-Fernández, R., Prats, E. and Jorrín-Novo, J. V.** 2010 "Proteomics of plant pathogenic fungi", *J Biomed Biotechnol.* 2010(2010): 36.

**Goodwin, P. H., Li, J. and Jin, S.** 2001 "A catalase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* is highly expressed during the necrotrophic phase of infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*", *Fems Microbiology Letters* 202(1): 103-107.

**Goswami, R. S., Xu, J.-R., Trail, F., Hilburn, K. and Kistler, H. C.** 2006 "Genomic analysis of host pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development", *Microbiology* 152(6): 1877-1890.

**Görlach, J.M., Van Der Knaap, E., Walton, J. D.** 1998 "Cloning and Targeted Disruption of MLG1, a Gene Encoding Two of Three Extracellular Mixed-Linked Glucanases of *Cochliobolus carbonum*." *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 385-391.

**Gotz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talan, M., Dopazo, J. and Conesa, A.** 2008 "High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite", *Nucleic Acids Research* 36(10): 3420-3435.

**Govrin, E. M. and Levine, A.** 2000 "The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*", *Current Biology: CB* 10(13): 751-757.

**Graves, P. R. and Haystead, T. A. J.** 2002 "Molecular Biologist's Guide to Proteomics", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1): 39-63.

**Greenberg, J. T.** 1997 "Programmed Cell Death In Plant-Pathogen Interactions", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1): 525-545.

**Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J. I. E., Selvaraj, G. and Wei, Y.** 2007 "The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence", *Molecular Plant Pathology* 8(4): 411-421.

**Grenier, J., Potvin, C. and Asselin, A.** 2000 "Some fungi express b-1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins" *Mycologia* 92: 841-848.

**Gronover, C. S., Kasulke, D., Tudzynski, P. and Tudzynski, B.** 2001 "The Role of G Protein Alpha Subunits in the Infection Process of the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(11): 1293-1302.

**Guedener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D., Hegemann, J. H.** 2002 "A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast." *Nucleic Acids Research* 30(6): e23.

**Guillén, Y. and Machuca, Á.** 2008 "The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(1): 31-37.

**Guillén, Y., Navias, D. and Machuca, Á.** 2009 "Tolerance to wood preservatives by copper-tolerant wood-rot fungi native to south-central Chile", *Biodegradation* 20(1): 135-142.

**Guilleroux, M. and Osbourn, A.** 2004 "Gene expression during infection of wheat roots by the "take-all" fungus *Gaeumannomyces graminis*", *Molecular Plant Pathology* 5(3): 203-216.

**Guldener, U., Seong, K. Y. and Boddu, J.** 2006 "Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta". *Fungal Genet Biol* 43: 316-325.

- Gullino, L., Leroux, P. and Smith, C.** 2000 "Uses and challenges of novel compounds for plant disease control", *Crop Protection* 19(1): 1-11.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A. and Sverdlov, E. D.** 1996 "Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction: Cloning of Jurkat Cell Transcripts Induced by Phytohemagglutinin and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate", *Analytical Biochemistry* 240(1): 90-97.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K.** 1998 "MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1264-1300.
- Guzy, R. D.** 2007 "Mitochondrial Complex III is Required for Hypoxia-Induced ROS Production and Gene Transcription in Yeast", *Antioxidants & Redox Signaling* 9(9): 1317-1328.
- Gvozdeva, E. L., Ievleva, E. V., Gerasimova, N. G., Ozeretskovskaya, O. L. and Valueva, T. A.** 2004 "Exoproteinases of the Oomycete *Phytophthora infestans*", *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(2): 165-169.
- Ha, Y. S., Covert, S. F. and Momany, M.** 2006 "FfKS1, the 1,3- $\beta$ -Glucan Synthase from the Caspofungin-Resistant Fungus *Fusarium solani*", *Eukaryotic Cell* 5(7): 1036-1042.
- Haarmann, T., Lorenz, N. and Tudzynski, P.** 2008 "Use of a nonhomologous end joining deficient strain ([ $\Delta$ ]ku70) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis", *Fungal Genetics and Biology* 45(1): 35-44.
- Haas, H., Eisendle, M. and Turgeon, B. G.** 2008 "Siderophores in Fungal Physiology and Virulence", *Annual Review of Phytopathology* 46(1): 149-187.
- Hadas, Y., Goldberg, I., Pines, O. and Prusky, D.** 2007 "Involvement of Gluconic Acid and Glucose Oxidase in the Pathogenicity of *Penicillium expansum* in Apples", *Phytopathology* 97(3): 384-390.
- Hadibarata, T., Yusoff, A. R. M., Aris, A. and Kristanti, R. A.** 2012 "Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022", *Journal of Environmental Sciences* 24(4): 728-732.
- Hall, Q. and Cannon, M. C.** 2002 "The Cell Wall Hydroxyproline-Rich Glycoprotein RSH Is Essential for Normal Embryo Development in Arabidopsis", *The Plant Cell Online* 14(5): 1161-1172.
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y. J., Akutsu, K. and Hibi, T.** 2001 "PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*", *Pest Management Science* 57(9): 839-843.
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y. J., Makizumi, Y., Akutsu, K. and Hibi, T.** 2000 "Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*", *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3421-3426.
- Hamamoto, H., Nawata, O., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y. J., Makizumi, Y., Akutsu, K. and Hibi, T.** 2001 "The Role of the ABC Transporter Gene PMR1 in Demethylation Inhibitor Resistance in *Penicillium digitatum*", *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70(1): 19-26.
- Hammerschmidt, R.** 1999 "Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2): 77-84.
- Hammond, T. M. and Keller, N. P.** 2005 "RNA Silencing in *Aspergillus nidulans* Is Independent of RNA-Dependent RNA Polymerases", *Genetics* 169(2): 607-617.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D.** 1996 "Resistance gene-dependent plant defense responses", *The Plant Cell Online* 8(10): 1773-91.
- Harding, P. R., Jr.** 1962 "Differential sensitivity to sodium orthophenylphenate by biphenyl-sensitive and biphenyl-resistant strains of *Penicillium digitatum*.", *Plant Disease* 46: 100-104.
- Harding, P. R., Jr.** 1968 "Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation", *Plant Dis.* 52(3): 245-247.
- Harel, A., Bercovich, S. and Yarden, O.** 2006 "Calcineurin Is Required for Sclerotial Development and Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Oxalic Acid-Independent Manner", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(6): 682-693.

- Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C. E. and Robbins, P. W. 1992 "Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(15): 6846-6850.
- Have, A. t., Espino, J. J., Dekkers, E., Van Sluyter, S. C., Brito, N. I., Kay, J., González, C. and van Kan, J. A. L. 2010 "The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family", *Fungal Genetics and Biology* 47(1): 53-65.
- Have, A. t., Mulder, W., Visser, J. and van Kan, J. A. L. 1998 "The Endopolygalacturonase Gene Bcpg1 Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(10): 1009-1016.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H. J. and De Waard, M. A. 2002 "Bcmfs1, a Novel Major Facilitator Superfamily Transporter from *Botrytis cinerea*, Provides Tolerance towards the Natural Toxic Compounds Camptothecin and Cercosporin and towards Fungicides", *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4996-5004.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Sugiura, H. and De Waard, M. A. 2001 "Multidrug Resistance in *Botrytis cinerea* Associated with Decreased Accumulation of the Azole Fungicide Oxpoconazole and Increased Transcription of the ABC Transporter Gene BcatrD", *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70(3): 168-179.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. 2005 "Glutathione transferases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45(1): 51-88.
- Heath, M. C. 2000 "Hypersensitive response-related death", *Plant Molecular Biology* 44(3): 321-334.
- Hedeler, C., Wong, H. M., Cornell, M. J., Alam, I., Soanes, D. M., Rattray, M., Hubbard, S. J., Talbot, N. J., Oliver, S. G., Paton, N. W. 2007 "e-Fungi: a data resource for comparative analysis of fungal genomes", *BMC Genomics* 8(1): 426.
- Hefferin, M. L. and Tomkinson, A. E. 2005 "Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining", *DNA Repair* 4(6): 639-648.
- Helenius, A., Aebi and Markus 2001 "Intracellular Functions of N-Linked Glycans", *Science* 291(5512): 2364-2369.
- Henry, C., Mouyna, I. and Latgé, J. P. 2007 "Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*", *Current Genetics* 51(4): 277-284.
- Herrmann, M. 1996 "Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of *Fusarium avenaceum*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(4): 226-232.
- Herron, S. R., Benen, J. A. E., Scavetta, R. D., Visser, J. and Jurnak, F. 2000 "Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8762-8769.
- Herscovics, A. and Orlean, P. 1993 "Glycoprotein biosynthesis in yeast", *The FASEB Journal* 7(6): 540-50.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kamper, J. and Bolker, M. 2006 "Identification of a Gene Cluster for Biosynthesis of Mannosylerythritol Lipids in the Basidiomycetous Fungus *Ustilago maydis*", *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8): 5469-5477.
- Hibino, T., Waditee, R., Araki, E., Ishikawa, H., Aoki, K., Tanaka, Y. and Takabe, T. 2002 "Functional Characterization of Choline Monooxygenase, an Enzyme for Betaine Synthesis in Plants", *Journal of Biological Chemistry* 277(44): 41352-41360.
- Higgins, C. F. 1992 "ABC Transporters: From Microorganisms to Man", *Annual Review of Cell Biology* 8(1): 67-113.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978 "Transformation of yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(4): 1929-1933.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1983 "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid", *Nature* 303(5913): 179-180.
- Hoi, J. W. S., Herbert, C., Bacha, N., O'Connell, R., Lafitte, C., Borderies, G., Rossignol, M., Rougé, P. and Dumas, B. 2007 "Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*", *Molecular Microbiology* 64(1): 68-82.



- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., Kamoun, S. 2009 "Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms". *Mol Plant Microbe Interact* 22: 115–122
- Holloman, D. W. 1993 "Resistance to azole fungicides in the field", *Biochem. Soc. Trans* 21: 1047-1051.
- Holmes, G., J. and Eckert, J. W. 1995 "Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*", *Plant Disease* 79: 1068-1073.
- Holmes, G. J. and Eckert, J. W. 1999 "Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest Citrus Fungicides in California", *Phytopathology* 89(9): 716-721.
- Holzinger, R., Sandoval-Soto, L., Rottenberger, S., Crutzen, P. J. and Kesselmeier, J. 2000 "Emissions of volatile organic compounds from *Quercus ilex* L. measured by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry under different environmental conditions", *J. Geophys. Res.* 105(D16): 20573-20579.
- Hong, S. I., Lee, H. H. and Kim, D. 2007 "Effects of hot water treatment on the storage stability of satsuma mandarin as a postharvest decay control", *Postharvest Biology and Technology* 43(2): 271-279.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A. 1993 "New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants", *Transgenic Research* 2(4): 208-218.
- Hooykaas, P. J. J. 1989 "Transformation of plant cells via *Agrobacterium*", *Plant Molecular Biology* 13(3): 327-336.
- Hooykaas, P. J. J., Klapwijk, P. M., Nuti, M. P., Schilperoort, R. A. and Rersch, A. 1977 "Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* T1 Plasmid to Avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*", *Journal of General Microbiology* 98(2): 477-484.
- Hooykaas, P. J. J., Roobol, C. and Schilperoort, R. A. 1979 "Regulation of the Transfer of T1 Plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*", *Journal of General Microbiology* 110(1): 99-109.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J. C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J., Deising, H. B. 2009 "Sfp-type 4-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity" *Plant Cell* 21: 3379–3396
- Hou, Z. X., Peng, Y. and Katan, T. 2002 "A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1119-1127.
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. and Rep, M. 2008 "Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector". *PLoS. Pathog.* 4, e1000061.
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W. and Rep, M. 2009 "The effector protein Avr2 of the xylem colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly" *Plant J.* 58, 970–97
- Howard, D. H. 1999 "Acquisition, Transport, and Storage of Iron by Pathogenic Fungi", *Clinical Microbiology Reviews* 12(3): 394-404.
- Howlett, B. J. 2006 "Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi", *Current Opinion in Plant Biology* 9(4): 371-375.
- Hsu, H. L., Yannone, S. M. and Chen, D. J. 2002 "Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4", *DNA Repair* 1(3): 225-235.
- Hu, G., Hacham, M., Waterman, S. R., Panepinto, J., Shin, S., Liu, X., Gibbons, J., Valyi-Nagy, T., Obara, K., Jaffe, H. A., Ohsumi, Y. and Williamson, P. R. 2008 "PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*", *The Journal of Clinical Investigation* 118(3): 1186-1197.
- Hua, S.-b., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L. and Luo, Y. 1997 "Minimum Length of Sequence Homology Required for *Vivo* Cloning by Homologous Recombination in Yeast", *Plasmid* 38(2): 91-96.
- Huang, C. C. and Lindhout, P. 1997 "Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2". *Euphytica*, 93, 145–153.

- Huang, Y., Deveral, B. and Morris, S. 1993 "Effect of *Pseudomonas cepacia*; on postharvest biocontrol of infection by *Penicillium digitatum*; and on wound responses of citrus fruit", *Australasian Plant Pathology* 22(3): 84-93.
- Irie, T., Matsumura, H., Terauchi, R. and Saitoh, H. 2003 "Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) of *Magnaporthe grisea* genes involved in appressorium formation", *Molecular Genetics and Genomics* 270(2): 181-189.
- Ishibashi, K., Suzuki, K., Ando, Y., Takakura, C. and Inoue, H. 2006 "Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(40): 14871-14876.
- Ismail, M. 2004 "Post-harvest Citrus Diseases and their control", *Outlooks on Pest Management* 15(1): 29-35.
- Ismail, M. and Brown, G. E. 1979 "Postharvest wound healing in citrus fruit: Induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 126-129.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Yamamoto, H. 2001 "Endopolygalacturonase Is Essential for Citrus Black Rot Caused by *Alternaria citri* but Not Brown Spot Caused by *Alternaria alternata*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(6): 749-757.
- Isshiki, A., Ohtani, K., Kyo, M., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. 2003 "Green Fluorescent Detection of Fungal Colonization and Endopolygalacturonase Gene Expression in the Interaction of *Alternaria citri* with Citrus", *Phytopathology* 93(7): 768-773.
- Jackson, B. J., Kukuruzinska, M. A. and Robbins, P. 1993 "Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the *alg2* mutation", *Glycobiology* 3(4): 357-364.
- Jackson, B. J., Warren, C. D., Bugge, B. and Robbins, P. W. 1989 "Synthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Man2GlcNAc2 and Man1GlcNAc2 are transferred from dolichol to protein in vivo", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 272(1): 203-209.
- Jacob-Wilk, D., Moretti, M., Turina, M., Kazmierczak, P. and Van Alfen, N. K. 2012 "Differential expression of the putative *Kex2* processed and secreted aspartic proteinase gene family of *Cryphonectria parasitica*", *Fungal Biology* 116(3): 363-378.
- Jain, S., Akiyama, K., Kan, T., Ohguchi, T. and Takata, R. 2003 "The G protein subunit FGB1 regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*", *Current Genetics* 43(2): 79-86.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.-P. and Mauch-Mani, B. 2001 "β-Aminobutyric Acid-induced Resistance in Plants", *European Journal of Plant Pathology* 107(1): 29-37.
- Janus, D., Hoff, B. and Kuck, U. 2009 "Evidence for Dicer-dependent RNA interference in the industrial penicillin producer *Penicillium chrysogenum*", *Microbiology* 155(12): 3946-3956.
- Jarai, G. and Buxton, F. 1994 "Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*", *Current Genetics* 26(3): 238-244.
- Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Togni, G., Latgé, J.-P. and Monod, M. 1994 "Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*", *Molecular Microbiology* 14(5): 917-928.
- Jayani, R. S., Saxena, S. and Gupta, R. 2005 "Microbial pectinolytic enzymes: A review", *Process Biochemistry* 40(9): 2931-2944.
- Jellison, J., Connolly, J., Goodell, B., Doyle, B., Illman, B., Fekete, F. and Ostrofsky, A. 1997 "The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi", *International Biodeterioration and Biodegradation* 39(23): 165-179.
- Jennings, D. B., Ehrenshaft, M., Pharr, D. M., Williamson, J. D. 1998 "Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(25): 15129-15133
- Jentschke, G. and Godbold, D. L. 2000 "Metal toxicity and ectomycorrhizas", *Physiologia Plantarum* 109(2): 107-116.

- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. and Valent, B. 2000 "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance", *EMBO J* 19(15): 4004-4014.
- Joner, E. J. and Leyval, C 2003 "Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions", *Agronomie* 23(5-6): 495-502.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. 2006 "The plant immune system", *Nature* 444(7117): 323-329.
- Joosten, M. H. A. J., and de Wit, P. J. G. M. 1999. "The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions". *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 335-367
- Joosten, M.H.A., Vogelsang, R., Cozijnsen, T.J., Verberne, M.C. and De Wit, P.J.G.M. 1997 "The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors" *Plant Cell*, 9, 367-379.
- Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Gupta, V. S. and Ranjekar, P. K. 1998 "Cysteine Protease Inhibitor from Pearl Millet: A New Class of Antifungal Protein", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246(2): 382-387.
- Jung, W. H., Sham, A., White, R. and Kronstad, J. W. 2006 "Iron Regulation of the Major Virulence Factors in the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*", *PLoS Biol* 4(12): e410.
- Jurick li, W. M., Dickman, M. B. and Rollins, J. A. 2004 "Characterization and functional analysis of a cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit gene (*pka1*) in *Sclerotinia sclerotiorum*", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64(3): 155-163.
- Kader, A. A. and Arpaia, M. L. 2002 "Postharvest handling systems: subtropical fruits", in A. A. Kader (ed) *Postharvest technology of horticultural crops*, Oakland, CA, USA: University of California Agriculture and Natural Resources.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2003 "RNA Silencing in the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe oryzae*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(9): 769-776.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2004 "One of the Two Dicer-like Proteins in the Filamentous Fungi *Magnaporthe oryzae* Genome Is Responsible for Hairpin RNA-triggered RNA Silencing and Related Small Interfering RNA Accumulation", *Journal of Biological Chemistry* 279(43): 44467-44474.
- Kahmann, R. and Basse, C. 2001 "Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization", *Current Opinion in Microbiology* 4(4): 374-380.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. and Chernin, L. 2003 "Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases", *Soil Biology and Biochemistry* 35(2): 323-331.
- Kamoun, S. 2006. "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes" *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:41-60.
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Muller, O., Perlin, M. H., Wosten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. and Birren, B. W. 2006 "Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*", *Nature* 444(7115): 97-101.
- Kanetis, L., Forster, H. and Adaskaveg, J. E. 2007 "Comparative Efficacy of the New Postharvest Fungicides Azoxystrobin, Fludioxonil, and Pyrimethanil for Managing Citrus Green Mold", *Plant Disease* 91(11): 1502-1511.
- Kano, S., Kurita, T., Kanematsu, S. and Morinaga, T. 2011 "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Rosellinia necatrix*", *Microbiology* 80(1): 82-88.

- Karlsson, M., Olson, Å. K. and Stenlid, J.** 2003 "Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine", *Fungal Genetics and Biology* 39(1): 51-59.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A.E., van Kan, J. A. L.** 2005 "Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*". *Plant J* 43: 213-225.
- Kato, M.** 2005 "An Overview of the CCAAT-Box Binding Factor in Filamentous Fungi: Assembly, Nuclear Translocation, and Transcriptional Enhancement", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69(4): 663-672.
- Kahmann, R. and Kämper J.** 2004 "*Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development." *New Phytologist* 164(1): 31-42.
- Kaufman, G., Horwitz, B. A., Hadar, R., Ullmann, Y. and Berdicevsky, I.** 2004 "Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for pathogenic development of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*", *Microbiology* 150(8): 2785-2790.
- Kavanagh, J. A. and Wood, R. K. S.** 1967 "The role of wounds in the infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc", *Annals of Applied Biology* 60(3): 375-383.
- Kell, D. B., Brown, M., Davey, H. M., Dunn, W. B., Spasic, I. and Oliver, S. G.** 2005 "Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message", *Nat Rev Micro* 3(7): 557-565.
- Keller, N. P. Nesbitt., C. and Sarr, B.** 1997 "pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp", *Phytopathology* 87: 643-648.
- Keon, J., Antoniow, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J. L., Baker, J. M., Beale, M. H., Hammond-Kosack, K. and Rudd, J. J.** 2007 "Transcriptional Adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of Its Susceptible Wheat Host." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(2): 178-193.
- Kershaw, M. J. and Talbot, N. J.** 2009 "Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Kershaw, M. J., Wakley, G. and Talbot, N. J.** 1998 "Complementation of the Mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins", *EMBO J* 17(14): 3838-3849.
- Khalaj, V., Eslami, H., Azizi, M., Rovira-Graells, N. and Bromley, M.** 2007 "Efficient downregulation of alb1 gene using an AMA1-based episomal expression of RNAi construct in *Aspergillus fumigatus*", *Fems Microbiology Letters* 270(2): 250-254.
- Kikot, G. E., Hours, R. A. and Alconada, T. M.** 2009 "Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review", *Journal of Basic Microbiology* 49(3): 231-241.
- Kim, H. J., Chen, C., Kabbage, M., Dickman, M. B.** 2011 "Identification and Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH Oxidases." *Applied and Environmental Microbiology* 77(21): 7721-7729
- Kim, B. E., Nevitt, T. and Thiele, D. J.** 2008 "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation", *Nat Chem Biol* 4(3): 176-185.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S. and Park, Y.** 2009 "Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity", *International Journal of Molecular Sciences* 10(6): 2860-2872.
- Kim, K. S., Min, J. Y. and Dickman, M. B.** 2008 "Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development", *Molecular Plant Microbe Interactions* 21(5): 605-612.
- Kim, Y. T., Prusky, D. O. V. and Rollins, J. A.** 2007 "An activating mutation of the *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene increases oxalic acid production at low pH but decreases virulence", *Molecular Plant Pathology* 8(5): 611-622.
- Kinay, P., Mansour, M. F., Gabler, F. M., Margosan, D. A. and Smilanick, J. L.** 2007 "Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California", *Crop Protection* 26: 647-656.
- Kinay, P., Yildiz, F., Sen, F., Yildiz, M. and Karacali, I.** 2005 "Integration of pre- and postharvest treatments to minimize *Penicillium* decay of *Satsuma mandarins*", *Postharvest Biology and Technology* 37(1): 31-36.

- Kinay, P. and Yildiz, M.** 2008 "The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit", *Biological Control* 45(3): 433-440.
- Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N.** 1999 "Sequence Analysis, Overexpression, and Antisense Inhibition of a beta -Xylosidase Gene, *xylA*, from *Aspergillus oryzae* KBN616", *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1): 20-24.
- Kitanovic, A., Nguyen, M., Vogl, G., Hartmann, A., Günther, J., Würzner, R., Künkel, W., Wölfl, S. and Eck, R.** 2005 "Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification", *FEMS Yeast Research* 5(4-5): 431-439.
- Klieber, A., Scott, E. and Wuryatmo, E.** 2002 "Effect of method of application on antifungal efficacy of citral against postharvest spoilage fungi of citrus in culture", *Australasian Plant Pathology* 31(4): 329-332.
- Klinman, J. P.** 1996 "Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates", *Chemical Reviews* 96(7): 2541-2562.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Spinks, C. A., Worthington, P. A., Youle and D** 1997 "Rationale And Perspectives On The Development Of Fungicides", *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 349-372.
- Koenraad, H., Somerville, S. C. and Jones, A. L.** 1992 "Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi", *Phytopathology* 82(11): 1348-1354.
- Koiwa, H., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M.** 1997 "Regulation of protease inhibitors and plant defense", *Trends in Plant Science* 2(10): 379-384.
- Kojima, K., Kikuchi, T., Takano, Y., Oshiro, E. and Okuno, T.** 2002 "The Mitogen-Activated Protein Kinase Gene MAF1 Is Essential for the Early Differentiation Phase of Appressorium Formation in *Colletotrichum lagenarium*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(12): 1268-1276.
- Kooistra, R., Hooykaas, P. J. J. and Steensma, H. Y.** 2004 "Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*", *Yeast* 21(9): 781-792.
- Kornitzer, D.** 2006 "The Ubiquitin System and Morphogenesis of Fungal Pathogens", *IMAJ* 8: 243-245.
- Kozlovskii, A., Zhelifonova, V., Vinokurova, N. and Ozerskaya, S.** 2000 "Effect of microelements on the biosynthesis of secondary metabolites by the fungus *Penicillium citrinum* thom VKM F-1079", *Microbiology* 69(5): 536-540.
- Krappmann, S., Sasse, C. and Braus, G. H.** 2006 "Gene Targeting in *Aspergillus fumigatus* by Homologous Recombination Is Facilitated in a Nonhomologous End- Joining-Deficient Genetic Background", *Eukaryotic Cell* 5(1): 212-215.
- Kraus, P. R. and Heitman, J.** 2003 "Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311(4): 1151-1157.
- Kronstad, J., De Maria, A., Funnell, D., Laidlaw, R. D., Lee, N., de Sá, M. M. and Ramesh, M.** 1998 "Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways", *Archives of Microbiology* 170(6): 395-404.
- Kück, U. and Hoff, B.** 2010 "New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi", *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(1): 51-62.
- Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. E. and Jackson, B. J.** 1987 "Protein Glycosylation in Yeast", *Annual Review of Biochemistry* 56(1): 915-944.
- Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., Roe, B. A. and Murphy, J. W.** 2004 "Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi", *Eukaryotic Cell* 3(5): 1088-1100.
- Kvalnes-Krick, K. and Jorns, M. S.** 1991 "Role of the covalent and noncovalent flavins in sarcosine oxidase", in F. Muller (ed) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, Boca Raton: CRC Press Inc.,.

- Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M., Baek, D. H., Kim, Y. C. and Cerniglia, C.** 2008 "A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases", *BMC Biochemistry* 9(1): 11.
- Lahlali, R., Serrhini, M. N. and Jijakli, M. H.** 2004 "Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco", *Communications in agricultural and applied biological sciences* 69(4): 601-609.
- Lamb, C. and Dixon, R. A.** 1997 "The oxidative burst in plant disease resistance", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1): 251-275.
- Lang, C. and Dörnenburg, H.** 2000 "Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases", *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(4): 366-375.
- Lanza, G., Di Martino Aleppo, E. and Strano, M. C.** 2004 "Evaluation of alternative treatments to control green mold in citrus fruit.", *Acta Horticulturae* 632: 343-349.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J.** 2003 "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*". *Mol Microbiol* 50: 1241-1255
- Larraya, L. M., Boyce, K. J., So, A., Steen, B. R., Jones, S., Marra, M. and Kronstad, J. W.** 2005 "Serial Analysis of Gene Expression Reveals Conserved Links between Protein Kinase A, Ribosome Biogenesis, and Phosphate Metabolism in *Ustilago maydis*", *Eukaryotic Cell* 4(12): 2029-2043.
- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M. and Jancova, D.** 2001 *The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions*, Vol. 108, Stuttgart, ALLEMAGNE: Ulmer.
- Leckie, F., Mattei, B., Capodicasa, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G. and Cervone, F.** 1999 "The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed [beta]-strand/[beta]-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability", *EMBO J* 18(9): 2352-2363.
- Lee, J. D. and Kolattukudy, P. E.** 1995 "Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung", *Infect. Immun.* 63(10): 3796-3803.
- Lee, S., Kim, S. H. and Breuil, C.** 2002 "The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi", *Forest Pathology* 32(3): 153-161.
- Lee, S.-H., Lee, J., Lee, S., Park, E.-H., Kim, K.-W., Kim, M.-D., Yun, S.-H. and Lee, Y.-W.** 2009 "GzSNF1 Is Required for Normal Sexual and Asexual Development in the Ascomycete *Gibberella zeae*", *Eukaryotic Cell* 8(1): 116-127.
- Lees, N., Skaggs, B., Kirsch, D. and Bard, M.** 1995 "Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*—A review", *Lipids* 30(3): 221-226.
- Leger, R. J. S., Joshi, L. and Roberts, D. W.** 1997 "Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches", *Microbiology* 143(6): 1983-1992.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J.** 2000 "Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 746-785.
- Leslie, J. F. and Dickman, M. B.** 1991 "Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)", *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5): 1423-1429.
- Leung, H., Lehtinen, U., Karjalainen, R., Skinner, D., Tooley, P., Leong, S. and Ellingboe, A.** 1990 "Transformation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* to hygromycin B resistance", *Current Genetics* 17(5): 409-411.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H. and Horwitz, B. A.** 1999 "A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: Diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(23): 13542-13547.

- Levin, D. E.** 2005 "Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2): 262-291.
- Li, D., Ashby, A. M. and Johnstone, K.** 2003 "Molecular Evidence that the Extracellular Cutinase Pbc1 Is Required for Pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on *Oilseed rape*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(6): 545-552.
- Li, G. C., Jin, L. P., Xie, J. Y and Qu, D. Y.** 2004 "The principle of suppression subtractive hybridization technique and its application in plant gene isolation", *China Biotechnol.* 24: 26-32.
- Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G. and Borkovich, K. A.** 2007 "Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi", *Annual Review of Microbiology* 61(1): 423-452.
- Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A. G., Saguin-Swartz, G., Coutu, C. and Hegedus, D. D.** 2004 "Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with a resistant *Brassica napus* cultivar: expressed sequence tag analysis identifies genes associated with fungal pathogenesis", *Fungal Genetics and Biology* 41(8): 735-753.
- Liew, C. L. Prage., R. K.** 1994 "Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L)", *American Society for Horticultural Science* 119: 563-567.
- Lill, R. and Mühlenhoff, U.** 2005 "Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes", *Trends in Biochemical Sciences* 30(3): 133-141.
- Link, T. A.** 1997 "The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (QP) site of the cytochrome bc1 complex: The 'proton-gated affinity change' mechanism", *FEBS Letters* 412(2): 257-264.
- Lippincott-Schwartz, J. and Patterson, G. H.** 2003 "Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells", *Science* 300(5616): 87-91.
- Lipscomb, W. N. and Strater, N.** 1996 "Recent Advances in Zinc Enzymology", *Chemical Reviews* 96(7): 2375-2434.
- Lisker, N., Cohen, L., Chalutz, E. and Fuchs, Y.** 1983 "Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruits", *Physiological Plant Pathology* 22(3): 331-338.
- Liu, S. and Dean, R. A.** 1997 "G Protein Subunit Genes Control Growth, Development, and Pathogenicity of *Magnaporthe grisea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(9): 1075-1086.
- Liu, S., Oeljeklaus, S., Gerhardt, B. and Tudzynski, B.** 1998 "Purification and characterization of glucose oxidase of *Botrytis cinerea*", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53(2): 123-132.
- Liu, X. and Winey, M.** 2012 'The MPS1 Family of Protein Kinases', *Annual Review of Biochemistry* 81(1): 561-585.
- Liu, Z. M. and Kolattukudy, P. E.** 1999 "Early Expression of the Calmodulin Gene, Which Precedes Appressorium Formation in *Magnaporthe grisea*, Is Inhibited by Self-Inhibitors and Requires Surface Attachment", *J. Bacteriol.* 181(11): 3571-3577.
- Liu, Z., T. L. Friesen, Ling H., Meinhardt, S., Oliver, R. P., Rasmussen, J.B., Faris, J.D.** 2006 "The Tsn1-ToxA interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system." *Genome* 49(10): 1265-1273.
- Lombrana, M., Moralejo, F. J., Pinto, R. and Martin, J. F.** 2004 "Modulation of *Aspergillus awamori* Thaumatin Secretion by Modification of *bipA* Gene Expression", *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9): 5145-5152.
- Long, C. A., Deng, B. X. and Deng, X. X.** 2007 "Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit", *Annals of Microbiology* 57(2): 203-207.
- Loper, J. E. and Henkels, M. D.** 1999 "Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere", *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5357-5363.
- López, M. C. and Baker, H. V.** 2000 "Understanding the Growth Phenotype of the Yeast *gcr1* Mutant in Terms of Global Genomic Expression Patterns", *Journal of Bacteriology* 182(17): 4970-4978.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E. and Marcos, J. F.** 2000 "Identification and Characterization of a Hexapeptide with Activity against Phytopathogenic Fungi That Cause Postharvest Decay in Fruits", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(8): 837-846.

- López-García, B., Pérez-Paya, E. and Marcos, J. F. 2002 "Identification of Novel Hexapeptides Bioactive against Phytopathogenic Fungi through Screening of a Synthetic Peptide Combinatorial Library", *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2453-2460.
- López-García, B., Veyrat, A., Pérez-Payá, E., González-Candelas, L. and Marcos, J. F. 2003 "Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens", *International Journal of Food Microbiology* 89(2-3): 163-170.
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martínez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B. and Ciuffetti, L. M. 2001 "Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology", *Applied and Environmental Microbiology* 67(5): 1987-1994.
- Lorin, S., Dufour, E., Boulay, J., Begel, O., Marsy, S. and Sainsard-Chanet, A. 2001 "Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*", *Molecular Microbiology* 42(5): 1259-1267.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Pietro, A. and Harman, G. E. 1993 "Biolytic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA", *Current Genetics* 24(4): 349-356.
- Los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G., Miranda-Salcedo, M. and Peñ̄a-Cabriales, J. 2012 "*Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(8): 2615-2623.
- Lu, G., Jantasuriyarat, C., Zhou, B. and Wang, G. L. 2004 "Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*", *TAG Theoretical and Applied Genetics* 108(3): 525-534.
- Lu, J. P., Liu, T. B., Yu, X. Y. and Lin, F. C. 2005 "Representative appressorium stage cDNA library of *Magnaporthe grisea*", *J Zhejiang Univ Sci B* 6(2): 132-136.
- Lugones, L. G., Scholtmeijer, K., Klootwijk, R. and Wessels, J. G. H. 1999 "Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*", *Molecular Microbiology* 32(4): 681-689.
- Lui, L., Vikram, A., Abu-Nada, Y., Kushalappa, A., Raghavan, G. and Al-Mughrabi, K. 2005 "Volatile metabolic profiling for discrimination of potato tubers inoculated with dry and soft rot pathogens", *American Journal of Potato Research* 82(1): 1-8.
- Lulloff, S. J., Hahn, B. L. and Sohnle, P. G. 2004 "Fungal susceptibility to zinc deprivation", *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 144(4): 208-214.
- Lumsden, R. D. 1976 "Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean", *Canadian Journal of Botany* 54: 2630-2641.
- Luo, C.-X. and Schnabel, G. 2008 "The Cytochrome P450 Lanosterol 14 alpha-Demethylase Gene Is a Demethylation Inhibitor Fungicide Resistance Determinant in *Monilinia fructicola* Field Isolates from Georgia", *Applied and Environmental Microbiology* 74(2): 359-366.
- Lyon, G. D., Goodman, B. A., Williamson, B. 2004 "*Botrytis cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants". In Y Elad, B Williamson, P Tudzynski, N Delen, eds, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-141.
- Macarisin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M. and Droby, S. 2007 "*Penicillium digitatum* Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit", *Phytopathology* 97(11): 1491-1500.
- Maccabe, A. P., Orejas, M., Pérez-González, J. A. and Ramon, D. 1998 "Opposite Patterns of Expression of Two *Aspergillus nidulans* Xylanase Genes with Respect to Ambient pH", *J. Bacteriol.* 180(5): 1331-1333.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K.-I., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J.-i., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I.,



- Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. and Kikuchi, H. 2005 "Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*", *Nature* 438(7071): 1157-1161.
- MacKenzie, D. A. J. D. J. A. D. B. 2004 "Filamentous fungi as expression systems for heterologous proteins.", *The Mycota II. Genetics and Biotechnology*: 289-315.
- MacPherson, S., Larochelle, M. and Turcotte, B. 2006 "A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(3): 583-604.
- Magro, P., Di Lenna, P., Marciano, P. and Pallavicini, C. 1980 "Variability of Polygalacturonase and Protein Isoelectric Focusing Patterns in *Botrytis cinerea* Isolates", *Journal of General Microbiology* 120(1): 105-109.
- Magro, P., Marciano, P. and Di Lenna, P. 1984 "Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*", *Fems Microbiology Letters* 24(1): 9-12.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., and Silar, P. 2004 "Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*". *Fung Genet Biol* 41: 982-997
- Malonek, S. and Meinhardt, F. 2001 "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Colonectria morgani*", *Current Genetics* 40(2): 152-155.
- Mandelc, S., Radisek, S., Jamnik, P. and Javornik, B. 2009 "Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop", *European Journal of Plant Pathology* 125(1): 159-171.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1957 "Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influence by carbon sources and metals", *Journal of Bacteriology* 73(2): 269-278.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. and Legendre, L. 2003 "Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*", *FEMS Microbiology Ecology* 43(3): 359-366.
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B. A. and Sharon, A. 1998 "Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*", *Mycological Research* 102(04): 491-496.
- Marcet-Houben, M., Ballester, A. B., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J. F., González-Candelas, L. and Gabaldón, T. 2012 "Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus", *BMC Genomics* 13:646.
- Marciano, P., Di Lenna, P. and Magro, P. 1983 "Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower", *Physiological Plant Pathology* 22(3): 339-345.
- Marcos, J. F., González-Candelas, L. and Zacarías, L. 2005 "Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs", *Journal of Experimental Botany* 56(418): 2183-2193.
- Marcucci, E., Aleandri, M. P., Chilosí, G. and Magro, P. 2010 "Induced Resistance by  $\beta$ -Aminobutyric Acid in Artichoke against White Mould Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*", *Journal of Phytopathology* 158(10): 659-667.
- Markaryan, A., Lee, J. D., Sirakova, T. D. and Kolattukudy, P. E. 1996 "Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides", *J. Bacteriol.* 178(8): 2211-2215.
- Marques, M. C., Alonso-Cantabrana, H., Forment, J., Arribas, R., Alamar, S., Conejero, V. and Perez-Amador, M. 2009 "A new set of ESTs and cDNA clones from full-length and normalized libraries for gene discovery and functional characterization in citrus", *BMC Genomics* 10(1): 428.
- Marrs, K. A. 1996 "The function and regulation of Glutathione S-transferase in plants", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1): 127-158.
- Martell, A. E., and Smith R. M. 1974 *Critical Stability Constants. Vol.1: Amino Acids*, New York and London: Plenum Press

- Martell, A. E., and Smith R. M.** 1975 *Critical Stability Constants. Vol.2: Amino Acids*, New York and London: Plenum Press
- Martin, D. E. and Hall, M. N.** 2005 "The expanding TOR signaling network", *Current Opinion in Cell Biology* 17(2): 158-166.
- Martínez-Espinoza, A. D. Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramírez, C. G. and Gold, S. E.** 2004 "MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*", *Curr. Microbiol* 49: 274-281.
- Maruthachalam, K., Klosterman, S., Kang, S., Hayes, R. and Subbarao, K.** 2011 "Identification of Pathogenicity-Related Genes in the Vascular Wilt Fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated T-DNA Insertional Mutagenesis", *Molecular Biotechnology* 49(3): 209-221.
- Mason, J. R. and Cammack, R.** 1992 "The Electron-Transport Proteins of Hydroxylating Bacterial Dioxygenases", *Annual Review of Microbiology* 46(1): 277-305.
- Mathew, G. M., Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., and Pandey, A.** 2008 "Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation", *Journal of Scientific and Industrial Research* 67(11): 898-907.
- Matsumura, H., Reich, S., Ito, A., Saitoh, H., Kamoun, S., Winter, P., Kahl, G. n., Reuter, M., KrÄ¼ger, D. H. and Terauchi, R.** 2003 "Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(26): 15718-15723.
- Maxwell, D. P. and Lumsden. R. D.** 1970 "Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture", *Phytopathology* 60: 1395-1398.
- Mayer, A. M., Staples, R. C. and Gilad, N. L.** 2001 "Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response", *Phytochemistry* 58(1): 33-41.
- McCafferty, H. R. K. and Talbot, N. J.** 1998 "Identification of three ubiquitin genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, one of which is highly expressed during initial stages of plant colonisation", *Current Genetics* 33(5): 352-361.
- McCann, M., Geraghty, M., Devereux, M., Shea, D., Mason, J. and Sullivan, L.** 2000 "Insights Into the Mode of Action of the Anti-*Candida* Activity of 1,10-Phenanthroline and its Metal Chelates", *Metal-Based Drugs* 7(4): 185-193.
- McCollum, G.** 2000 "Defensive proteins in grapefruit flavedo" *Proceedings of the 9th International Citrus Congress*
- McGuire, R. G.** 1994 "Application of *Candida guilliermondii* in Commercial Citrus Coatings for Biocontrol of *Penicillium digitatum* on Grapefruits", *Biological Control* 4(1): 1-7.
- McMurchie, E. J., McGlasson, W. B. and Eaks, I. L.** 1972 "Treatment of Fruit with Propylene gives Information about the Biogenesis of Ethylene", *Nature* 237(5352): 235-236.
- Meek, K., Gupta, S., Ramsden, D. A. and Lees-Miller, S. P.** 2004 "The DNA-dependent protein kinase: the director at the end", *Immunological Reviews* 200(1): 132-141.
- Mehdy, M. C.** 1994 "Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens", *Plant Physiology* 105(2): 467-472.
- Mehrabi, R. and Kema, G. H. J.** 2006 "Protein kinase A subunits of the ascomycete pathogen *Mycosphaerella graminicola* regulate asexual fructification, filamentation, melanization and osmosensing", *Molecular Plant Pathology* 7(6): 565-577.
- Mei, B., Budde, A. D. and Leong, S. A.** 1993 "*sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(3): 903-907.
- Meiss, E., Konno, H., Groth, G. and Hisabori, T.** 2008 "Molecular Processes of Inhibition and Stimulation of ATP Synthase Caused by the Phytotoxin Tentoxin", *Journal of Biological Chemistry* 283(36): 24594-24599.

- Melchers, L. S., Regensburg-Tuink, A. J. G., Schilperoort, R. A. and Hooykaas, P. J. J.** 1989 "Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression", *Molecular Microbiology* 3(7): 969-977.
- Melin, P. M., Schnürer, J. S. and Wagner, E. W.** 2002 "Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species", *Molecular Genetics and Genomics* 267(6): 695-702.
- Mendgen, K., Hahn, M. and Deising, H.** 1996 "Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi", *Annual Review of Phytopathology* 34(1): 367-386.
- Meng, S., Torto-Alalibo, T., Chibucos, M., Tyler, B. and Dean, R.** 2009 "Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms", *BMC Microbiology* 9(Suppl 1): S7.
- Mercier, J. and Smilanick, J. L.** 2005 "Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodora albus*", *Biological Control* 32(3): 401-407.
- Mey, G., Oeser, B., Lebrun, M. H. and Tudzynski, P.** 2002 "The Biotrophic, Non-Appressorium-Forming Grass Pathogen *Claviceps purpurea* Needs a Fus3/Pmk1 Homologous Mitogen-Activated Protein Kinase for Colonization of Rye Ovarian Tissue", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(4): 303-312.
- Meyer, V. Wedde, K. and Stahl, L.** 2002 "Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*", *Molecular Genetics and Genomics* 266(5): 747-757.
- Meyer, V.** 2008 "Genetic engineering of filamentous fungi Progress, obstacles and future trends", *Biotechnology Advances* 26(2): 177-185.
- Meyer, V., Arentshorst, M., El-Ghezal, A., Drews, A.-C., Kooistra, R., van den Hondel, C. A. M. J. J. and Ram, A. F. J.** 2007 "Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant", *Journal of Biotechnology* 128(4): 770-775.
- Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T. and Stahl, U.** 2003 "Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*", *Current Genetics* 43(5): 371-377.
- Meziane, Hamid, Gavriel, Sagi, Ismailov, Zafar, Chet, Ilan, Chernin, Leonid, Fte and Monica** 2006 Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action, Vol. 39, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., van den Hondel, C. A. M. J. J. and Ram, A. F. J.** 2005 "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi", *Current Genetics* 48(1): 1-17.
- Michielse, C. B., J Hooykaas, P. J., J J van den Hondel, C. A. M. and J Ram, A. F.** 2008 "*Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*", *Nat. Protocols* 3(10): 1671-1678.
- Mingot, J. M., Espeso, E. A., Díez, E. and Peñalva, M.** 2001 "Ambient pH Signaling Regulates Nuclear Localization of the *Aspergillus nidulans* PacC Transcription Factor", *Molecular and Cellular Biology* 21(5): 1688-1699.
- Mitchell, T. K. and Dean, R. A.** 1995 "The cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Required for Appressorium Formation and Pathogenesis by the Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*", *The Plant Cell Online* 7(11): 1869-1878.
- Mittler, R.** 2002 "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance", *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Miyara, I., Shafran, H., Kramer Haimovich, H., Rollins, J., Sherman, A. and Prusky, D.** 2008 "Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits", *Molecular Plant Pathology* 9(3): 281-291.
- Mlikota, G., Franka, Smilanick, Joseph, L., Mansour, Monir, F., Karaca and Hakan** 2010 Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes, Vol. 55, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
- Moalemiyan, M., Vikram, A. and Kushalappa, A. C.** 2007 "Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS", *Postharvest Biology and Technology* 45(1): 117-125.

- Moalemiyan, M., Vikram, A., Kushalappa, A. C. and Yaylayan, V.** 2006 "Volatile metabolite profiling to detect and discriminate stem-end rot and anthracnose diseases of mango fruits", *Plant Pathology* 55(6): 792-802.
- Möbius, N. and Hertweck, C.** 2009 "Fungal phytotoxins as mediators of virulence", *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 390-398.
- Modi, H. A.** 2010 "Regulation of Exoglucanase and Endoglucanase Biosynthesis in *Streptomyces* Species", *J. Adv. Dev. Res.* 1(1): 16-20.
- Moerschbacher, B. M., Mierau, M., Graeßner, B., Noll, U. and Mort, A. J.** 1999 "Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves", *Journal of Experimental Botany* 50(334): 605-612.
- Molina, L. z. and Kahmann, R.** 2007 "An *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification Is Required for Virulence", *The Plant Cell Online* 19(7): 2293-2309.
- Monod, M., Paris, S., Sanglard, D., Jatton-Ogay, K., Bille, J. and Latge, J. P.** 1993 "Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*", *Infect. Immun.* 61(10): 4099-4104.
- Moore, S., De Vries, O. M. H. and Tudzynski, P.** 2002 "The major Cu, Zn SOD of the phytopathogen *Claviceps purpurea* is not essential for pathogenicity", *Molecular Plant Pathology* 3(1): 9-22.
- Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Lombrana, M., Fierro, F. and Martin, J. F.** 2002 "Silencing of the Asperillopepsin B (*pepB*) Gene of *Aspergillus awamori* by Antisense RNA Expression or Protease Removal by Gene Disruption Results in a Large Increase in Thaumatin Production", *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7): 3550-3559.
- Moriwaki, A., Kubo, E., Arase, S. and Kihara, J.** 2006 "Disruption of SRM1, a mitogen-activated protein kinase gene, affects sensitivity to osmotic and ultraviolet stressors in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*", *Fems Microbiology Letters* 257(2): 253-261.
- Moriwaki, A., Ueno, M., Arase, S. and Kihara, J.** 2007 "RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*", *Fems Microbiology Letters* 269(1): 85-89.
- Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I. and Kudo, T.** 2005 "An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast", *Current Genetics* 47(5): 298-306.
- Motteram, J., Lovegrove, A., Pirie, E., Marsh, J., Devonshire, J., van de Meene, A., Hammond-Kosack, K. and Rudd, J. J.** 2011 "Aberrant protein N-glycosylation impacts upon infection-related growth transitions of the haploid plant-pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*", *Molecular Microbiology* 81(2): 415-433.
- Mouyna, I., Henry, C., Doering, T. L. and Latgé, J. P.** 2004 "Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*", *Fems Microbiology Letters* 237(2): 317-324.
- Movahedi, S. and Heale, J. B.** 1990 "Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36(4): 289-302.
- Movahedi, S. and Heale, J. B.** 1990 "The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36(4): 303-324.
- Moy, P., Qutob, D., Chapman, B. P., Atkinson, I., Gijzen, M.** 2004 "Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*", *Mol Plant Microbe Interact.* 17 (10): 1051-1052
- Moye-Rowley, W. S.** 2003 "Regulation of the Transcriptional Response to Oxidative Stress in Fungi: Similarities and Differences", *Eukaryotic Cell* 2(3): 381-389.
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Russo, M. P., Cunsolo, V., Saletti, R., Reforgiato Recupero, G. and Foti, S.** 2009 "Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time", *Journal of Proteomics* 73(1): 134-152.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. and Kahmann, R.** 1999 "The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*", *Molecular Microbiology* 34(5): 1007-1017.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M. and Kang, S.** 2001 "Agrobacterium-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer",

*Phytopathology* 91(2): 173-180.

**Mullins, E. D. and Kang, S.** 2001 "Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants", *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(14): 2043-2052.

**Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T., Hughes, H. B., MacCallum, D. M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M. A. J., Bain, J. M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L. M., Brown, A. J. P., Odds, F. C. and Gow, N. A. R.** 2005 "Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* Are Partially Redundant alpha-1,2-Mannosyltransferases That Participate in O-Linked Mannosylation and Are Required for Adhesion and Virulence", *Journal of Biological Chemistry* 280(2): 1051-1060.

**Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., Prats, E.** 2008 "The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?" *J Exp Bot* 59:501-520

**Murphy, J. M., and J. D. Walton** 1996 "Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*": cloning and targeted disruption of ALP1", *Mol. Plant Microbe Interact* 9: 290-297.

**Muthuvijayan, V. M.** 2004 "In silico Reconstruction of Nutrient-Sensing Signal Transduction Pathways in *Aspergillus nidulans*", *In Silico Biology* 4(4): 605-631.

**Mysore, K. S. and Ryu, C. M.** 2004 "Nonhost resistance: how much do we know?", *Trends in Plant Science* 9(2): 97-104.

**Nadas, A., Olmo, M. and García, J. M.** 2003 "Growth of *Botrytis cinerea* and Strawberry Quality in Ozone-enriched Atmospheres", *Journal of Food Science* 68(5): 1798-1802.

**Nathues, E., Joshi, S., Tenberge, K. B., von den Driesch, M., Oeser, B., Bäumer, N., Mihlan, M. and Tudzynski, P.** 2004 "CPTF1, a CREB-Like Transcription Factor, Is Involved in the Oxidative Stress Response in the *Phytopathogen Claviceps purpurea* and Modulates ROS Level in Its Host *Secale cereale*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(4): 383-393.

**Nakaune, Hamamoto, Imada, Akutsu and Hibi** 2002 "A novel ABC transporter gene, *PMR* is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*", *Molecular Genetics and Genomics* 267(2): 179-185.

**Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K. and Hibi, T.** 1998 "A Novel ATP-Binding Cassette Transporter Involved in Multidrug Resistance in the Phytopathogenic Fungus *Penicillium digitatum*", *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3983-3988.

**Nakayashiki, H., Hanada, S., Quoc, N. B., Kadotani, N., Tosa, Y. and Mayama, S.** 2005 "RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi", *Fungal Genetics and Biology* 42(4): 275-283.

**Nakayashiki, H. and Nguyen, Q. B.** 2008 "RNA interference: roles in fungal biology", *Current Opinion in Microbiology* 11(6): 494-502.

**Namekawa, S. H., Iwabata, K., Sugawara, H., Hamada, F. N., Koshiyama, A., Chiku, H., Kamada, T. and Sakaguchi, K.** 2005 "Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing", *Microbiology* 151(11): 3669-3678.

**Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** 1990 "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans", *The Plant Cell Online* 2(4): 279-289.

**Naumann, T. A., Wicklow, D. T. and Price, N. P. J.** 2011 "Identification of a Chitinase-modifying Protein from *Fusarium verticillioides*", *Journal of Biological Chemistry* 286(41): 35358-35366.

**Navarre, D. A. and Wolpert, T. J.** 1995 "Inhibition of the Glycine Decarboxylase Multienzyme Complex by the Host-Selective Toxin Victorin", *The Plant Cell Online* 7(4): 463-471.

**Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** 2006 "A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*", *Genetics* 172(3): 1557-1566.

**Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J.** 2002 "Hydrogen peroxide signalling", *Current Opinion in Plant Biology* 5(5): 388-395.

**Nevalainen, K. M. H., Teo, V. S. J. and Bergquist, P. L.** 2005 "Heterologous protein expression in filamentous fungi",

*Trends in Biotechnology* 23(9): 468-474.

**Ng, T. B.** 2004 "Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins", *Peptides* 25(7): 1215-1222.

**Ngiam, C., Jeenes, D. J., Punt, P. J., Van Den Hondel, C. A. M. J. J. and Archer, D. B.** 2000 "Characterization of a Foldase, Protein Disulfide Isomerase A, in the Protein Secretory Pathway of *Aspergillus niger*", *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2): 775-782.

**Nicholson, R. L. and Hammerschmidt, R.** 1992 "Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance", *Annual Review of Phytopathology* 30(1): 369-389.

**Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S. and Ruiz-Vázquez, R. M.** 2007 "Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects", *Fungal Genetics and Biology* 44(6): 504-516.

**Nielsen, K. F. and Smedsgaard, J. r.** 2003 "Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography UV mass spectrometry methodology", *Journal of Chromatography A* 1002(2): 111-136.

**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., Lord, A., Lu, C., 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., Pertea, M., Price, C., Pritchard, B. L., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.-A., Reichard, U., Renauld, 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(7071): 1151-1156.

**Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt Iii, B. F. and Dangl, J. L.** 2003 "Recognition and response in the plant immune system", *Annual Review of Genetics* 37(1): 579-609.

**Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C. and Inoue, H.** 2004 "Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(33): 12248-12253.

**Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M. and Hibi, T.** 1999 "Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase", *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99(3): 383-390.

**Noda, T., Matsunaga, K., Taguchi-Atarashi, N. and Yoshimori, T.** 2010 "Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics", *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21(7): 671-676.

**Noir, S., Colby, T., Harzen, A., Schmidt, J. and Panstruga, R.** 2009 "A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores", *Molecular Plant Pathology* 10(2): 223-236.

**Nowrousian, M.** 2010 "Next-Generation Sequencing Techniques for Eukaryotic Microorganisms: Sequencing-Based Solutions to Biological Problems", *Eukaryotic Cell* 9(9): 1300-1310.

**Obagwu, J. and Korsten, L.** 2003 "Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water", *Postharvest Biology and Technology* 28(1): 187-194.

**Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K. and Turgeon, B. G.** 2006 "NPS6, Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic Ascomycetes", *The Plant Cell Online* 18(10): 2836-2853.

**Oliver, S. G.** 1992 "The complete DNA sequence of yeast chromosome III", *Nature* 357(6373): 38-46.

**Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. and Baganz, F.** 1998 "Systematic functional analysis of the yeast genome",

*Trends in Biotechnology* 16(9): 373-378.

**Olivieri, F. P., Maldonado, S., Tonón, C. V. and Casalongué, C. A.** 2004 "Hydrolytic Activities of *Fusarium solani* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* Associated with the Infection Process of Potato Tubers", *Journal of Phytopathology* 152(6): 337-344.

**Olsson, L., Christensen, T. M. I. E., Hansen, K. P. and Palmqvist, E. A.** 2003 "Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30", *Enzyme and Microbial Technology* 33(5): 612-619.

**Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E. and 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(3): 1760-1766.

**Ospina-Giraldo, M., Mullins, E. and Kang, S.** 2003 "Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*", *Current Genetics* 44(1): 49-57.

**Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M. and Kohmoto, K.** 1998 "Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52(5): 285-295.

**Ozeki, K., Kyoya, F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M. and Nunokawa, Y.** 1994 "Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation", *Biosci Biotechnol Biochem* 58(12): 2224-7.

**Pacheco, N., Larralde-Corona, C. P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A. and Shirai, K.** 2008 "Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*", *International Journal of Biological Macromolecules* 43(1): 20-26.

**Pfaffl, M. W.** 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29(9): e45.

**Palou, L., Smilanick, J. L., Joseph, L., Crisosto, C. H., Carlos, H., Mansour and Monir** 2001 Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit, Vol. 85, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.

**Palou, L., Crisosto, C. H., Smilanick, J. L., Adaskaveg, J. E. and Zoffoli, J. P.** 2002 "Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage", *Postharvest Biology and Technology* 24(1): 39-48.

**Palou, L., Usall, J., Muñoz, J. A., Smilanick, J. L. and Viñas, I.** 2002 "Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins", *Postharvest Biology and Technology* 24(1): 93-96.

**Palou, L., Usall, J., Smilanick, J. L., Aguilar, M. J. and Viñas, I.** 2002 "Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit", *Pest Management Science* 58(5): 459-466.

**Palou, L. s., Crisosto, C. H. and Garner, D.** 2007 "Combination of postharvest antifungal chemical treatments and controlled atmosphere storage to control gray mold and improve storability of *Wonderful pomegranates*", *Postharvest Biology and Technology* 43(1): 133-142.

**Palou, L. S., Jacas, J. A., Marcilla, A., Alonso, M. and del Rao, M. A.** 2008 "Physico-chemical and sensory quality of *Clemenules* mandarins and survival of the Mediterranean fruit fly as affected by complementary cold and carbon dioxide quarantine treatments", *Postharvest Biology and Technology* 48(3): 443-450.

**Palou, L. S., Smilanick, J. L., Usall, J. and Viñas, I.** 2001 "Control of Postharvest Blue and Green Molds of Oranges by Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate", *Plant Disease* 85(4): 371-376.

**Pandey, A., Roca, M. G., Read, N. D. and Glass, N. L.** 2004 "Role of a Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway during Conidial Germination and Hyphal Fusion in *Neurospora crassa*", *Eukaryotic Cell* 3(2): 348-358.

**Pane, C., Rekab, G., Firrao, M., Ruocco, M., and Scala, F.** 2008 "A novel gene coding for an ABC transporter in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia Fuckeliana*) is involved in resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>", *Journal of Plant Pathology* 90(3).

**Pao, S. S., Paulsen, I. T. and Saier, M. H., Jr.** 1998 "Major Facilitator Superfamily", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1): 1-

34.

**Park, S. M. and Kim, D. H.** 2004 "Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*", *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9(3): 217-222.

**Park, S. M., Choi, E. S., Kim, M. J., Cha, B. J., Yang, M. S. and Kim, D. H.** 2004 "Characterization of HOG1 homologue, *CpMK1*, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress", *Molecular Microbiology* 51(5): 1267-1277.

**Parks, L., Smith, S. and Crowley, J.** 1995 "Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast—A review", *Lipids* 30(3): 227-230.

**Pelser, P. T. and Eckert, J. W.** 1977 "Constituents of Orange Juice that Stimulate the Germination of Conidia of *Penicillium digitatum*", *Phytopathology* 67: 747-754.

**Peñalva, M. A. and Arst, H. N.** 2002 "Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 426-446.

**Peñalva, M. A. and Arst, J. H. N.** 2004 "Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeast", *Annual Review of Microbiology* 58(1): 425-451.

**Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E. and Arst, H. N., Jr** 2008 "Ambient pH gene regulation in fungi: making connections" *Trends Microbiol* 16, 291–300.

**Perfect, S. E. and Green, J. R.** 2001 "Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens", *Molecular Plant Pathology* 2(2): 101-108.

**Perpetua, N. S., Yubo, Y., Yasuda, N., Takano, Y., and Furusawa, I.** 1996 "Cloning and characterization of a melanin biosynthetic *thr1* reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*", *Molec. Plant-Microbe Interact* 9: 323-329.

**Perucho, R. and Tuset, J. J.** 2002 "Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en post-cosecha", *Levante Agrícola* 355: 101-106.

**Phalip, V., Delalande, F. o., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Dorsseleer, A. and Jeltsch, J. M.** 2005 "Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall", *Current Genetics* 48(6): 366-379.

**Pietro, A. D., Huertas-González, M. D., Gutierrez-Corona, J. F., Martínez-Cadena, G., Maglecz, E. and Roncero, M. I. G.** 2001 "Molecular Characterization of a Subtilase from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(5): 653-662.

**Pietro, A. D., 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", *Molecular Plant Pathology* 4(5): 315-325.

**Pimenta, R. S., Silva, F. L., Silva, J. F. M., Morais, P. B., Braga, D. b. T., Rosa, C. A. and Corra Jr, A.** 2008 "Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges", *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 85-90.

**Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J. L., Lamarca, N. and Viñas, I.** 2004 "Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and Curing Treatments To Control Established Infections of *Penicillium digitatum* on Lemons", *Journal of Food Protection* 67: 781-786.

**Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Abadías, M., Smilanick, J. L. and Viñas, I.** 2004 "The use of sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue moulds on citrus fruits", *Pest Management Science* 60(8): 815-821.

**Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Lamarca, N., Asensio, À. and Viñas, I.** 2003 "Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage", *Postharvest Biology and Technology* 28(1): 195-198.

**Pliego, C., Kanematsu, S., Ruano-Rosa, D., de Vicente, A., López-Herrera, C., Cazorla, F. M. and Ramos, C.** 2009 "GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*", *Fungal Genetics and Biology* 46(2): 137-145.



- Plummer, K. M., Clark, S. J., Ellis, L. M., Loganathan, A., Al-Samarrai, T. H., Rikkerink, E. H. A., Sullivan, P. A., Templeton, M. D. and Farley, P. C.** 2004 "Analysis of a Secreted Aspartic Peptidase Disruption Mutant of *Glomerella cingulata*", *European Journal of Plant Pathology* 110(3): 265-274.
- Pöggeler, S. and Kück, U.** 2006 "Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian ku70 ortholog", *Gene* 378: 1-10.
- Pohleven, F., M. Humar, S. Amartei and J. Benedik,** 2002. "Tolerance of wood decay fungi to commercial copper based wood preservatives". The International Research Group on Wood Preservation IRG/WP 02-30291
- Pollack, J. K., Harris, S. D. and Marten, M. R.** 2009 "Autophagy in filamentous fungi", *Fungal Genetics and Biology* 46(1): 1-8.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y. and Ohlrogge, J. B.** 2008 "Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin", *Trends in Plant Science* 13(5): 236-246.
- Porat, R, Daus, A, Weiss, B, Cohen, L, and Droby, S.** 2002 *Effects of combining hot water, sodium bicarbonate and biocontrol on postharvest decay of citrus fruit*, Vol. 77, Ashford, ROYAUME-UNI: Headley.
- Porat, R., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. and Droby, S.** 2003 "Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by  $\beta$ -Aminobutyric Acid", *European Journal of Plant Pathology* 109(9): 901-907.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R. and Droby, S.** 1999 "Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of Shamouti oranges", *Postharvest Biology and Technology* 15(2): 155-163.
- Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G. v., Rascle, C. and Fevre, M.** 2001 "Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*", *Microbiology* 147(3): 717-726.
- Poussereau, N., Gente, S., Rascle, C., Billon-Grand, G. and Fèvre, M.** 2001 "aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis", *FEMS Microbiology Letters* 194(1): 27-32.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J.** 1992 "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein", *Gene* 111(2): 229-233.
- Prenafeta-Boldú, F. X., Summerbell, R. and Sybren de Hoog, G.** 2006 "Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard?", *FEMS Microbiology Reviews* 30(1): 109-130.
- Prins, T. W., Wagemakers, L., Schouten, A. and Van Kan, J. A. L.** 2000 "Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant Pathology* 1(3): 169-178.
- Prithiviraj, B., Vikram, A., Kushalappa, A. C. and Yaylayan, V.** 2004 "Volatile Metabolite Profiling for the Discrimination of Onion Bulbs Infected by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis allii*", *European Journal of Plant Pathology* 110(4): 371-377.
- Prusky, D., Bazak, M. and Ben-Arie, R** 1985 "Development, persistence, survival, and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruit", *Phytopathology* 75: 877-882.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Leverentz, B. and Conway, W. S.** 2001 "Local Modulation of Host pH by *Colletotrichum* Species as a Mechanism to Increase Virulence", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(9): 1105-1113.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S. and Jones, R.** 2004 "Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit", *Phytopathology* 94(1): 44-51.
- Prusky, D. and Yakoby, N.** 2003 "Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?", *Molecular Plant Pathology* 4(6): 509-516.
- Qin, G., Liu, J., Cao, B., Li, B. and Tian, S.** 2011 "Hydrogen Peroxide Acts on Sensitive Mitochondrial Proteins to Induce Death of a Fungal Pathogen Revealed by Proteomic Analysis", *PLoS ONE* 6(7): e21945.
- Qin, G., Tian, S., Chan, Z. and Li, B.** 2007 "Crucial Role of Antioxidant Proteins and Hydrolytic Enzymes in

Pathogenicity of *Penicillium expansum*", *Molecular & Cellular Proteomics* 6(3): 425-438.

**Qin, G., Wang, Q., Liu, J., Li, B. and Tian, S.** 2009 "Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence", *PROTEOMICS* 9(17): 4241-4253.

**Quayyum, H. A., Gijzen, M. and Traquair, J. A.** 2003 "Purification of a Necrosis-Inducing, Host-Specific Protein Toxin from Spore Germination Fluid of *Alternaria panax*", *Phytopathology* 93(3): 323-328.

**Qutob, D., B. Kemmerling, et al.** 2006 "Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins." *The Plant Cell Online* 18(12): 3721-3744.

**Ramesh, M. V., Sirakova, T. and Kolattukudy, P. E.** 1994 "Isolation, characterization, and cloning of cDNA and the gene for an elastolytic serine proteinase from *Aspergillus flavus*", *Infection and Immunity* 62(1): 79-85.

**Rampitsch, C., Bykova, N. V., McCallum, B., Beimcik, E. and Ens, W.** 2006 "Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction", *PROTEOMICS* 6(6): 1897-1907.

**Rast, J. P., Amore, G., Calestani, C., Livi, C. B., Ransick, A. and Davidson, E. H.** 2000 "Recovery of Developmentally Defined Gene Sets from High-Density cDNA Macroarrays", *Developmental Biology* 228(2): 270-286.

**Rauscher, M., Mendgen, K. and Deising, H.** 1995 "Extracellular Proteases of the Rust Fungus *Uromyces viciae-fabae*", *Experimental Mycology* 19(1): 26-34.

**Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J.** 2004 "MEROPS: the peptidase database", *Nucleic Acids Research* 32(suppl 1): D160-D164.

**Rebrikov, D. V., Desai, S. M., Siebert, P. D. and Lukyanov, S. A.** 2004 "Suppression Subtractive Hybridization", *Methods in Molecular Biology*. 258. 107-134

**Reddy, P. V., Lam, C. K. and Belanger, F. C.** 1996 "Mutualistic Fungal Endophytes Express a Proteinase that Is Homologous to Proteases Suspected to Be Important in Fungal Pathogenicity", *Plant Physiology* 111(4): 1209-1218.

**Reichard, U., Monod, M., Odds, F. and Rachel, R.** 1997 "Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall", *Medical Mycology* 35(3): 189-196.

**Rensink, W. A. and Buell, C. R.** 2005 "Microarray expression profiling resources for plant genomics", *Trends in Plant Science* 10(12): 603-609.

**Reyes, G., Romans, A., Nguyen, C. K. and May, G. S.** 2006 "Novel Mitogen-Activated Protein Kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* Is Required for Utilization of Polyalcohol Sugars", *Eukaryotic Cell* 5(11): 1934-1940.

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

**Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G. and Cornelissen, B. J. C.** 2004 "A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato". *Mol. Microbiol.* 53, 1373-1383

**Rhodes, D. and Hanson, A. D.** 1993 "Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44(1): 357-384.

**Richard, M. L. and Plaine, A.** 2007 "Comprehensive Analysis of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Candida albicans*", *Eukaryotic Cell* 6(2): 119-133.

**Ridley, B. L., O'Neill, M. A. and Mohnen, D.** 2001 "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling", *Phytochemistry* 57(6): 929-967.

**Rispail, N. and Di Pietro, A.** 2009 "*Fusarium oxysporum* Ste12 Controls Invasive Growth and Virulence Downstream of the Fmk1 MAPK Cascade", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(7): 830-839.

**Robbertse, B., Yoder, O. C., Nguyen, A., Schoch, C. L. and Turgeon, B. G.** 2003 "Deletion of all *Cochliobolus heterostrophus* Monofunctional Catalase-Encoding Genes Reveals a Role for One in Sensitivity to Oxidative Stress but None with a Role in Virulence", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(11): 1013-1021.

- Rodov, Victor, Agar, Tayfun, Peretz, Jacob, Nafussi, Beatrice, Kim, Jong, J., Ben, Y. and Shimshon** 2000 Effect of combined application of heat treatments and plastic packaging on keeping quality of 'Oroblanco' fruit (*Citrus grandis* L. x *C. paradisi* Macf.), Vol. 20, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Fang, D. Q., Kim, J. J. and Ashkenazi, R.** 1995 "Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(4): 1057-1061.
- Rodriguez, R. J., Low, C., Bottema, C. D. K. and Parks, L. W.** 1985 "Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 837(3): 336-343.
- Rogers, L. M., Flaishman, M. A. and Kolattukudy, P. E.** 1994 "Cutinase Gene Disruption in *Fusarium solani* f sp pisi Decreases Its Virulence on Pea", *The Plant Cell Online* 6(7): 935-945.
- Rogers, L. M., Kim, Y.-K., Guo, W., González-Candelas, L., Li, D. and Kolattukudy, P. E.** 2000 "Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(17): 9813-9818.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B. and Tudzynski, P.** 2004 "Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable", *Molecular Plant Pathology* 5(1): 17-27.
- Rolland, S. p., Bruel, C., Rascle, C., Girard, V., Billon-Grand, G. V. and Poussereau, N.** 2009 "pH controls both transcription and post-translational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*", *Microbiology* 155(6): 2097-2105.
- Rollins, J. A.** 2003 "The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(9): 785-795.
- Rollins, J. A. and Dickman, M. B.** 2001 "pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a pacC/RIM1 Homolog", *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 75-81.
- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J. and Klausner, R. D.** 1993 "The fission yeast ferric reductase gene frp1+ is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase", *Molecular and Cellular Biology* 13(7): 4342-4350.
- Román, E., Arana, D. M., Nombela, C. S., Alonso-Monge, R. and Pla, J. S.** 2007 "MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence", *Trends in Microbiology* 15(4): 181-190
- Romano, N. and Macino, G.** 1992 "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences", *Molecular Microbiology* 6(22): 3343-3353.
- Rooney, H. C. E., van't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A. L., Joosten, M. H. A. J., Jones, J. D. G. and de Wit, P. J. G. M.** 2005 "*Cladosporium Avr2* Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance", *Science* 308(5729): 1783-1786.
- Rosslenbroich, H.-J. and Stuebler, D.** 2000 "*Botrytis cinerea* -- history of chemical control and novel fungicides for its management", *Crop Protection* 19(8-10): 557-561.
- Ruijter, G. J. G., van de Vondervoort, P. J. I. and Visser, J.** 1999 "Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese", *Microbiology* 145(9): 2569-2576.
- Ruijter, G. J. G. and Visser, J.** 1997 "Carbon repression in aspergilli", *FEMS Microbiology Letters* 151(2): 103-114.
- Ruiz-Díez, B.** 2002 "Strategies for the transformation of filamentous fungi", *Journal of Applied Microbiology* 92(2): 189-195.
- Rutherford, J. C. and Bird, A. J.** 2004 "Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells", *Eukaryotic Cell* 3(1): 1-13.
- Ryan, C. A.** 1990 "Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens",

*Annual Review of Phytopathology* 28(1): 425-449.

**Ryan, C. A. and Pearce, G.** 2003 "Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(Suppl 2): 14577-14580.

**Sacristán, S. and García-Arenal, F.** 2008 "The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations" *Mol Plant Pathol* 9: 369-384.

**Sagaram, U. S. and Shim, W. B.** 2007 "*Fusarium verticillioides* GBB1, a gene encoding heterotrimeric G protein  $\beta$  subunit, is associated with fumonisin B1 biosynthesis and hyphal development but not with fungal virulence", *Molecular Plant Pathology* 8(4): 375-384.

**Saks, Y. and Barkai-Golan, R.** 1995 "Aloe vera gel activity against plant pathogenic fungi", *Postharvest Biology and Technology* 6(1-2): 159-165.

**Samson, R. A. Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. and Filtenborg, O.** 1995 "Introduction to Food-borne Fungi", in R. A. H. Samson, E.S; Frisvad, J. C; Filtenborg, O (ed) *Introduction to Food-borne Fungi*, Baarn, Netherlands: Centralalbureau voor Schimmelcultures.

**Samuels, N. M. and Klinman, J. P.** 2005 "2,4,5-Trihydroxyphenylalanine Quinone Biogenesis in the Copper Amine Oxidase from *Hansenula polymorpha* with the Alternate Metal Nickel", *Biochemistry* 44(43): 14308-14317.

**Sánchez-Torres, P. and González-Candelas, L.** 2003 "Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*", *Molecular Plant Pathology* 4(6): 447-457.

**Sánchez-Torres, P. and Tuset, J. J.** 2010 "Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus", *Postharvest Biology and Technology* 59(2): 159-165.

**Sanderson, P. G. and Spotts., R. A.** 1995 "Postharvest decay of winter pear and apple fruit cause by species of *Penicillium*", *Phytopathology* 85: 103-110.

**Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** 1977 "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5467.

**Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D. and Tosetti, M. I. S. d.** 2005 "Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts", *Postharvest Biology and Technology* 35(3): 245-251.

**Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L.** 2008 "Metschnikowia pulcherrima strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion", *Postharvest Biology and Technology* 49(1): 121-128.

**Sarig, P., Zahavi, T., Zutkhi, Y., Yannai, S., Lisker, N. and Ben-Arie, R.,** 1996 "Ozone for control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*.", *Physiol. Mol. Plant Pathol* 48: 403-415.

**Schaeffer, H. J., Jeykam, J. and Walton, J. D.** 1994 "Cloning and targeted gene disruption of EXG1, encoding exo-beta 1, 3-gluconase, in the phytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*"., *Appl Environ Microbiol* 60(2): 594-8.

**Schaible, U. E. and Kaufmann, S. H. E.** 2004 "Iron and microbial infection", *Nat Rev Micro* 2(12): 946-953.

**Scheffer, R. P. Ullstrup, A. J.** 1965 "A host-specific toxic metabolic from *Helminthosporium carbonum*", *Phytopathology* 55: 1037-1038.

**Scheffer, H. V. Ulvskov, P.** 2010 "Hemicelluloses", *Annual Review of Plant Biology* 61:263-289

**Schirra, M., Cabras, P., Angioni, A., D'Hallewin, G., Ruggiu, R. and Minelli, E. V.** 1997 "Effect of Heated Solutions on Decay Control and Residues of Imazalil in Lemons", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(10): 4127-4130.

**Schirra, M. and D'Hallewin, G.** 1997 "Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips", *Postharvest Biology and Technology* 10(3): 229-238.

**Schirra, M., D'Hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A. and Garau, V. L.** 1998 "Seasonal Susceptibility of Tarocco Oranges to Chilling Injury As Affected by Hot Water and Thiabendazole Postharvest Dip Treatments", *Journal of*

*Agricultural and Food Chemistry* 46(3): 1177-1180.

**Schirra, M. and Mulas, M.** 1995 "Improving storability of Tarocco oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments", *Postharvest Biology and Technology* 6(1-2): 129-138.

**Schmidt, L. S., Ghosop, J. M., Margosan, D. A. and Smilanick, J. L.** 2006 "Mutation at beta-Tubulin Codon 200 Indicated Thiabendazole Resistance in *Penicillium digitatum* Collected from California Citrus Packinghouses", *Plant Disease* 90(6): 765-770.

**Schoonbeek, H. J., van Nistelrooy, J. G. M. and de Waard, M. A.** 2003 "Functional Analysis of ABC Transporter Genes From *Botrytis cinerea* Identifies BcatrB as a Transporter of Eugenol", *European Journal of Plant Pathology* 109(9): 1003-1011.

**Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M. E., Bos, J., Haas, B. J., Zody, M. C., Nusbaum, C., Win, J. O. E., Thines, M. and Kamoun, S.** 2009 "Ten things to know about oomycete effectors", *Molecular Plant Pathology* 10(6): 795-803.

**Schouten, A.** 2002 "Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant Pathology* 3(4): 227-238.

**Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., Haynes, K. and Haas, H.** 2004 "Siderophore Biosynthesis But Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence", *The Journal of Experimental Medicine* 200(9): 1213-1219.

**Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst, H. N., Jr., Haynes, K. and Haas, H.** 2007 "Distinct Roles for Intra- and Extracellular Siderophores during *Aspergillus fumigatus* Infection", *PLoS Pathog* 3(9): 128.

**Schumacher, J., de Larrinoa, I. F. and Tudzynski, B.** 2008 "Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development, and Full Virulence on Bean Plants", *Eukaryotic Cell* 7(4): 584-601.

**Scott-Craig, J. S., Cheng, Y. Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J. W. and Walton, J. D.** 1998 "Targeted Mutants of *Cochliobolus carbonum*" Lacking the Two Major Extracellular Polygalacturonases", *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1497-1503.

**Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. and Walton, J. D.** 1990 "Endopolygalacturonase Is Not Required for Pathogenicity of *Cochliobolus carbonum*" on Maize", *The Plant Cell Online* 2(12): 1191-1200.

**Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J. and Tudzynski, P.** 2008 "NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(6): 808-819.

**Sellem, C. H., Lemaire, C., Lorin, S. v., Dujardin, G. V. and Sainsard-Chanet, A.** 2005 "Interaction Between the *oxa1* and *rmp1* Genes Modulates Respiratory Complex Assembly and Life Span in *Podospora anserina*", *Genetics* 169(3): 1379-1389.

**Seong, K., Hou, Z., Tracy, M., Kistler, H. C. and Xu, J. R.** 2005 "Random Insertional Mutagenesis Identifies Genes Associated with Virulence in the Wheat Scab Fungus *Fusarium graminearum*", *Phytopathology* 95(7): 744-750.

**Sesma, A. and Osbourn, A. E.** 2004 "The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi", *Nature* 431(7008): 582-586.

**Shevchik, V. E., Boccara, M., Vedel, R. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.** 1998 "Processing of the pectate lyase Pell by extracellular proteases of *Erwinia chrysanthemi* 3937", *Molecular Microbiology* 29(6): 1459-1469.

**Shieh, M., Brown, R. L., Whitehead, M. P., Carey, J. W., Cotty, P. J., and Cleveland, T. E., and Dean, R. A.** 1997 "Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, *P2c*, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls", *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3548-3552.

**Shiotani, H. and Tsuge, T.** 1995 "Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*", *Molecular and General Genetics MGG* 248(2): 142-150.

**Showalter, A. M.** 1993 "Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins", *The Plant Cell Online* 5(1): 9-23.

- Silva, M. G., Schrank, A., Bailão, E. F. L. C., Bailão, A. M., Borges, C. L., Staats, C. C., Parente, J. A., Pereira, M., Salem-Izacc, S. M., Mendes-Giannini, M. J. S., Zancopé-Oliveira, R. M., Rosa E Silva, L. K., Nosanchuk, J. D., Vainstein, M. H. and Soares, C. M. D. A. 2011 "The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis", *Frontiers in Microbiology* 2.
- Singh, D. 2002 "Bio-efficacy of *Debaryomyces hansenii* on the Incidence and Growth of *Penicillium italicum* on Kinnow Fruits in Combination with Oil and Wax Emulsions", *Annals of Plant Protection Sciences* 10(2): 272-276.
- Skamnioti, P. and Gurr, S. J. 2007 "*Magnaporthe grisea* Cutinase2 Mediates Appressorium Differentiation and Host Penetration and Is Required for Full Virulence", *The Plant Cell Online* 19(8): 2674-2689.
- Skinner, W., Bailey, A., Renwick, A., Keon, J., Gurr, S. and Hargreaves, J. 1998 "A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*", *Current Genetics* 34(5): 393-398.
- Smilanick, J. L., Gouin, B., C. C., Margosan, D. A., Bull, C. T., and Mackey, B. E. 1996 Virulence on citrus of *Pseudomonas syringae* strains that control postharvest green mold of citrus fruit, Vol. 80, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., and Henson, D. J. 1995 Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold lemons, Vol. 79, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F. Usall, J. and Michael, I. F. 1999 Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy, Vol. 83, St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M. and Sorenson, D. 2008 "Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides", *Postharvest Biology and Technology* 47(2): 226-238.
- Snoek, I. S. I., van der Krogt, Z. A., Touw, H., Kerkman, R., Pronk, J. T., Bovenberg, R. A. L., van den Berg, M. A. and Daran, J. M. 2009 "Construction of an *hdfA* *Penicillium chrysogenum* strain impaired in non-homologous end-joining and analysis of its potential for functional analysis studies", *Fungal Genetics and Biology* 46(5): 418-426.
- Soanes, D. M., Skinner, W., Keon, J., Hargreaves, J. and Talbot, N. J. 2002 "Genomics of Phytopathogenic Fungi and the Development of Bioinformatic Resources", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(5): 421-427.
- Sommer, N. F., Maxie, E. C., Fortlage, R. J. and Eckert, J. W. 1964 "Sensitivity of Citrus fruit decay fungi to gamma irradiation", *Radiation Botany* 4(3): 317-322.
- Song, A. H., Li, H. Y and Liu, X. H. 2004 "Isolation and regeneration of protoplasts from *Penicillium digitatum* ", *Chin. J. Agric. Biotechnology* 3: 197-202.
- Song, A. H., Li, H. and Xie, Q. 2003 "Sequence comparison of CYP51 genes between imazalil-sensitive and imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum*", *Mycosystema* 22: 153-156.
- Spalding, D. H. and Reeder, W. F. 1976 "pressure (hypobaric) storage of limes", *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 367-370.
- Spalding, D. H. and Reeder, W. F. 1987 "Effect of hot water and gamma radiation on postharvest decay of grapefruit", *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 98: 207-208.
- Spanu, P. D., Abbott, J. C., Amselem, J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Staber, K., Loren van Themaat, E. V., Brown, J. K. M., Butcher, S. A., Gurr, S. J., Lebrun, M.-H., Ridout, C. J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N. J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G. R., Benjdia, M., Bidzinski, P., Bindschedler, L. V., Both, M., Brewer, M. T., Cadle-Davidson, L., Cadle-Davidson, M. M., Collemare, J., Cramer, R., Frenkel, O., Godfrey, D., Harriman, J., Hoede, C., King, B. C., Klages, S., Kleemann, J., Knoll, D., Koti, P. S., Kreplak, J., López-Ruiz, F. J., Lu, X., Maekawa, T., Mahanil, S., Micali, C., Milgroom, M. G., Montana, G., Noir, S., O'Connell, R. J., Oberhaensli, S., Parlange, F., Pedersen, C., Quesneville, H., Reinhardt, R., Rott, M., Sacristán, S., Schmidt, S. M., Schan, M., Skamnioti, P., Sommer, H., Stephens, A., Takahara, H., Thordal-Christensen, H., Vigouroux, M., Weling, R., Wicker, T. and Panstruga, R. 2010 "Genome Expansion and Gene Loss in Powdery Mildew Fungi Reveal Tradeoffs in Extreme Parasitism", *Science* 330(6010):

1543-1546.

**Spellig, T., Bottin, A. and Kahmann, R.** 1996 "Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*", *Molecular and General Genetics MGG* 252(5): 503-509.

**Sposato, P., Ahn J. H., Walton J. D.** 1995 "Characterization and disruption of a gene in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*" encoding a cellulase lacking a cellulose binding domain and hinge region", *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 602-609.

**Sreedhar, L., Kobayashi, D. Y., Bunting, T. E., Hillman, B. I. and Belanger, F. C.** 1999 "Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host", *Gene* 235(12): 121-129.

**St Leger, R. J., Nelson, J. O., Screen, S. E.** 1999 "The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity." *Microbiology* 145(10): 2691-2699.

**Stahl, D. J. and Schafer, W.** 1992 "Cutinase Is Not Required for Fungal Pathogenicity on Pea", *The Plant Cell Online* 4(6): 621-629.

**Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M. and Schulz, I.** 2001 "Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity", *Journal of Cell Science* 114(3): 609-622.

**Stergiopoulos, I. and Dewaard, M. A.** 2002 "Activity of Azole Fungicides and ABC Transporter Modulators on *Mycosphaerella graminicola*", *Journal of Phytopathology* 150(6): 313-320.

**Stergiopoulos, I., Zwiers, L.-H. and De Waard, M. A.** 2002 "Secretion of Natural and Synthetic Toxic Compounds from Filamentous Fungi by Membrane Transporters of the ATP-binding Cassette and Major Facilitator Superfamily", *European Journal of Plant Pathology* 108(7): 719-734.

**Stergiopoulos, I., De Kock, M. J. D., Lindhout, P. and De Wit, P. J. G. M.** 2007 "Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution". *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1271-1283.

**Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Pusey, P. L., Igwegbe, E. C. K., Kabwe, K., Mafolo, Y., Liu, J., Chalutz, E. and Droby, S.** 1997 "Integration of Ultraviolet (UV-C) Light with Yeast Treatment for Control of Postharvest Storage Rots of Fruits and Vegetables", *Biological Control* 10(2): 98-103.

**Stumpferl, S. W., Stephan, O. and Osiewacz, H. D.** 2004 "Impact of a Disruption of a Pathway Delivering Copper to Mitochondria on *Podospira anserina* Metabolism and Life Span", *Eukaryotic Cell* 3(1): 200-211.

**Subramanian, B., Bansal, V. K. and Kav, N. N. V.** 2004 "Proteome-Level Investigation of *Brassica carinata*-Derived Resistance to *Leptosphaeria maculans*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(2): 313-324.

**Suelmann, R. and Fischer, R.** 2000 "Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*", *Cell Motility and the Cytoskeleton* 45(1): 42-50.

**Suelmann, R., Sievers, N. and Fischer, R.** 1997 "Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*", *Molecular Microbiology* 25(4): 757-769.

**Sun, J. and Glass, N. L.** 2011 "Identification of the CRE-1 Cellulolytic Regulon in *Neurospora crassa*", *PLoS ONE* 6(9): e25654.

**Sun, X., Wang, J., Feng, D., Ma, Z. and Li, H.** 2011 "PdCYP51B a new putative sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis", *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1-13.

**Suto, M. and Tomita, F.** 2001 "Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(4): 305-311.

**Svaren, J., Schmitz, J. and Horz, W.** 1994 "The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the PHO5 promoter", *EMBO J.* 13(20): 4856-4862.

**Takahashi, T., Masuda, T. and Koyama, Y.** 2006 "Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*", *Molecular Genetics and Genomics* 275(5): 460-470.

- Takano, Y., Choi, W., Mitchell, T. K., Okuno, T. and Dean, R. A.** 2003 "Large scale parallel analysis of gene expression during infection-related morphogenesis of *Magnaporthe grisea*", *Molecular Plant Pathology* 4(5): 337-346.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K. and Furusawa, I.** 2000 "The *Colletotrichum lagenarium* MAP Kinase Gene CMK1 Regulates Diverse Aspects of Fungal Pathogenesis", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(4): 374-383.
- Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B.** 2007 "NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation". *Fung Genet Biol* 44: 1065-1076
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J. and Hamer, J. E.** 1993 "Identification and Characterization of MPG1, a Gene Involved in Pathogenicity from the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*", *The Plant Cell Online* 5(11): 1575-1590.
- Tan, K. C., Heazlewood, J. L., Millar, A. H., Thomson, G., Oliver, R. P. and Solomon, P. S.** 2008 "A Signaling-Regulated, Short-Chain Dehydrogenase of *Stagonospora nodorum* Regulates Asexual Development", *Eukaryotic Cell* 7(11): 1916-1929.
- Tan, K. C., Ipcho, S. V. S., Trengove, R. D., Oliver, R. P. and Solomon, P. S.** 2009 "Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology", *Molecular Plant Pathology* 10(5): 703-715.
- Tan, K. C., Trengove, R., Maker, G., Oliver, R. and Solomon, P.** 2009 "Metabolite profiling identifies the mycotoxin alternariol in the pathogen *Stagonospora nodorum*", *Metabolomics* 5(3): 330-335.
- Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Nishizawa, Y. and Minami, E.** 2010 "The Role of Catalase-Peroxidase Secreted by *Magnaporthe oryzae* During Early Infection of Rice Cells." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(2): 163-171
- Tate, R. L.** 1996 "Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals", *Soil Science* 161(12): 886,887.
- Tavallali, V., Karimi, S., Mohammadi, S., Hojati, S** 2008 "Effects of aminobutyric acid on the induction of resistance to *Penicillium italicum*", *World Appl. Sci. J* 5: 345-351.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. and Yonemoto, W.** 1990 "Camp-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes", *Annual Review of Biochemistry* 59(1): 971-1005.
- Teeri, T. T.** 1997 "Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases", *Trends in Biotechnology* 15(5): 160-167.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J. and Magan, N.** 1998 "Control of Blue Mold of Apples by Preharvest Application of *Candida sake* Grown in Media with Different Water Activity", *Phytopathology* 88(9): 960-964.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C. and Viñas, I.** 2001 "Improving Control of Green and Blue Molds of Oranges by Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and Sodium Bicarbonate", *European Journal of Plant Pathology* 107(7): 685-694.
- ten Have, A., Dekkers, E., Kay, J., Phylip, L. H. and van Kan, J. A. L.** 2004 "An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features", *Microbiology* 150(7): 2475-2489.
- ten Have, A., Mulder, W. Visser, J. and van Kan, J.A.L.** 1998 "The endopolygalacturonase gene *Bcpg 1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*", *Mol. Plant-Microbe Interact* 11: 1009-1016.
- ten Have, A., Tenberge, B., Jacques, A. E. and Tudzynski, P.** 2002 "The Contribution of Cell Wall Degrading Enzymes to Pathogenesis of Fungal Plant Pathogens", in J. W. Bennett (ed) *The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*, Vol. 11, Kiel (Germany).
- Tenberge, K. B., Beckedorf, M. Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M. and von den Driesch, M.** 2002. "In Situ Localization of AOS in Host-Pathogen Interactions." *Microscopy and Microanalysis* 8(SupplementS02): 250-251.
- Than, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P. and Brakhage, A. A.** 2007 "The Thioredoxin System of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*", *Journal of Biological Chemistry* 282(37): 27259-27269.
- Thara, V. K., Fellers, J. P. and Zhou, J.-M.** 2003 "In planta induced genes of *Puccinia triticina*", *Molecular Plant*



*Pathology* 4(1): 51-56.

**Thomas, S. W., Glaring, M. A., Rasmussen, S. r. W., Kinane, J. T. and Oliver, R. P.** 2002 "Transcript Profiling in the Barley Mildew Pathogen *Blumeria graminis* by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(8): 847-856.

**Thomas, S. W., Rasmussen, S. r. W., Glaring, M. A., Rouster, J. A., Christiansen, S. K. and Oliver, R. P.** 2001 "Gene Identification in the Obligate Fungal Pathogen *Blumeria graminis* by Expressed Sequence Tag Analysis", *Fungal Genetics and Biology* 33(3): 195-211.

**Thompson, S., Croft, N. J., Sotiriou, A., Piggins, H. D. and Crosthwaite, S. K.** 2008 "*Neurospora crassa* heat shock factor 1 Is an Essential Gene; a Second Heat Shock Factor-Like Gene, *hsf2*, Is Required for Asexual Spore Formation", *Eukaryotic Cell* 7(9): 1573-1581.

**ThrockWatson, J. D. and Sparkman, O.** 2007, *Introduction to Mass Spectrometry*.

**Tiedemann, A.** 1997 "Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50(3): 151-166.

**Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, .D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. and Arst, H. N.** 1995 "The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH.", *Embo Journal* 15(4): 779-790.

**Thomma, B. P. H. J., van Esse, H. P., Crous, P. W., and de Wit, P. J. G. M.** 2005. "*Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*". *Mol. Plant Pathol.* 6: 379-393.

**Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., Brakhage, A. A.** 2007 "The Thioredoxin System of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response." *Journal of Biological Chemistry* 282(37): 27259-27269.

**Tonukari, N. J.** 2003 "Enzymes and fungal virulence", *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*,7(1): 5-8.

**Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S. and Walton, J. D.** 2000 "The *Cochliobolus carbonum* *SNF1* Gene Is Required for Cell Wall-Degrading Enzyme Expression and Virulence on Maize", *The Plant Cell Online* 12(2): 237-248.

**Torres, R., Nunes, C., García, J. M., Abadías, M., Viñas, I., Manso, T., Olmo, M. and Usall, J.** 2007 "Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations", *European Journal of Plant Pathology* 118(1): 73-83.

**Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadías, M., Mir, N., Larrigaudiere, C. and Viñas, I.** 2011 "Anti-oxidant activity of oranges after infection with the pathogen *Penicillium digitatum* or treatment with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2", *Biological Control* 57(2): 103-109.

**Torres, R., Valentines, M. C., Usall, J., Viñas, I. and Larrigaudiere, C.** 2003 "Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit", *Postharvest Biology and Technology* 27(3): 235-242.

**Troncoso-Rojas, R. and Tiznado-Hernández, M. E.** 2007 "Natural compounds to control fungal postharvest diseases", in T.-H. M. Troncoso-Rojas R, González-León A (ed) *Recent advances in alternative postharvest technologies to control fungal diseases in fruits and vegetables*, Trivandrum, Kerala, India: Transworld Research Network.

**Truesdell, G. M., Yang, Z. and Dickman, M. B.** 2000 "A G[alpha] subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56(3): 131-140.

**Turlin, E., Perrotte-Piquemal, M., Danchin, A. and Biville, F.** 2001 "Regulation of the Early Steps of 3-Phenylpropionate Catabolism in *Escherichia coli*", *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 3(1): 127-133.

**Tuset, J. J.** 1987 "Podredumbres de los frutos cítricos", *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)*.

- Tuset, J. J.** 1999 "Perspectivas del control de las podredumbres en la Postcosecha de cítricos", *Levante Agrícola* 348.
- Tzima, A., Paplomatas, E. J., Rauyaree, P. and Kang, S.** 2010 "Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*", *Fungal Genetics and Biology* 47(5): 406-415.
- Tzima, A. K., Paplomatas, E. J., Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M. D. and Kang, S.** 2011 "VdSNF1, the Sucrose Nonfermenting Protein Kinase Gene of *Verticillium dahliae*, Is Required for Virulence and Expression of Genes Involved in Cell-Wall Degradation", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(1): 129-142.
- Ubalua, A. O. and Oti, E.** 2008 "Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens", *African Journal of Biotechnology* 6(21): 2447-2450.
- Urban, M., Bhargava, T. and Hamer, J. E.** 1999 "An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease", *EMBO J* 18(3): 512-521.
- Usall, J., Smilanick, Palou, L., Denis, A. N., Teixido, Torres, R. and Viñas, I.** 2008 Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit, Vol. 50, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
- Valente, M., Infantino, A. and Aragona, M.** 2011 "Molecular and functional characterization of an endoglucanase in the phytopathogenic fungus *Pyrenochaeta lycopersici*", *Current Genetics* 57(4): 241-251.
- Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hurl, A. and Brakhage, A. A.** 2008 "The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response", *Fungal Genetics and Biology* 45(5): 618-627.
- van den Berg, M. A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J. H., Daran, J.-M., M Driessen, A. J., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N. D., Harris, D. M., Heijne, W. H. M., Joardar, V., W Kiel, J. A. K., Kovalchuk, A., Martin, J. F., Nierman, W. C., Nijland, J. G., Pronk, J. T., Roubos, J. A., van der Klei, I. J., van Peij, N. N. M. E., Veenhuis, M., von Dohren, H., Wagner, C., Wortman, J. and Bovenberg, R. A. L.** 2008 "Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*", *Nat Biotech* 26(10): 1161-1168.
- van den Burg, H. A., Westerink, N., Francoijs, K. J., Roth, R., Woestenenk, E., Boeren, S., De Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J. and Vervoort, J.** 2003 "Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability". *J. Biol. Chem.* 278, 27340-27346.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J., and de Wit, P. J. G. M.** 2006 "*Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection". *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1420-1430
- van der Does, H. C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C. and Rep, M.** 2008 "The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates". *Environ. Microbiol.* 10, 1475-1485.
- van Esse, H. P., Thomma, B. P. H. J., van't Klooster, J. W., and de Wit, P. J. G. M.** 2006 "Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast". *J. Exp. Bot.* 57: 599-608
- Van Ho, A., Ward, D. M. and Kaplan, J.** 2002 "Transition metal transport in yeast", *Annual Review of Microbiology* 56(1): 237-261.
- van Kan, J. A. L., van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T. and van der Vlugt-Bergmans, C. J. B.** 1997. "Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato". *Mol Plant Microbe Interact* 10, 30-38.
- van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J.** 2006 "Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants", *Annual Review of Phytopathology* 44(1): 135-162.
- Van Vu, B., Itoh, K., Nguyen, Q. B., Tosa, Y. and Nakayashiki, H.** 2012 "Cellulases Belonging to Glycoside Hydrolase Families 6 and 7 Contribute to the Virulence of *Magnaporthe oryzae*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(9): 1135-1141.
- VanEtten, H. D., Sandrock, R. W., Wasmann, C. C., Soby, S. D., McCluskey, K. and Wang, P.** 1995 "Detoxification of

phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi”, *Canadian Journal of Botany* 73(S1): 518-525.

**Vankuyk, P. A., Diderich, J. A., MacCabe, A. P., Hererro, O., Ruijter, G. J. G. and Visser, J.** 2004 “*Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H<sup>+</sup> symporter which is regulated in response to extracellular pH”, *Biochem. J.* 379(2): 375-383.

**Vautard-Mey, G., Cotton, P. and Fèvre, M.** 1999 “Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*”, *European Journal of Biochemistry* 266(1): 252-259.

**Vautard-Mey, G. and Fèvre, M.** 2003 “Carbon and pH Modulate the Expression of the Fungal Glucose Repressor Encoding Genes”, *Current Microbiology* 46(2): 0146-0150.

**Veal, E. A., Day, A. M. and Morgan, B. A.** 2007 “Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling”, *Molecular cell* 26(1): 1-14.

**Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N. and Morgan, B. A.** 2002 “Distinct Roles for Glutathione S-Transferases in the Oxidative Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*”, *Journal of Biological Chemistry* 277(38): 35523-35531.

**Velazhahan, R., Datta, S. K. and Muthukrishnan, S.** 1999 “The PR-5 family: thaumatin-like proteins” *Pathogenesis-related Proteins in Plants*. Eds. S.K. Datta and S. Muthukrishnan. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 107–129.

**Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** 1995 “Serial Analysis of Gene Expression”, *Science* 270(5235): 484-487.

**Veluchamy, S., Williams, B., Kim, K. and Dickman, M. B.** 2011 “The CuZn superoxide dismutase from *Sclerotinia sclerotiorum* is involved with oxidative stress tolerance, virulence, and oxalate production”, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78(0): 14-23.

**Verhoeff, K., Leeman, M., van Peer, R., Posthuma, L., Schot, N. and van Eijk, G. W.** 1988 “Changes in pH and the Production of Organic Acids During Colonization of Tomato Petioles by *Botrytis cinerea*”, *Journal of Phytopathology* 122(4): 327-336.

**Vernekar, J. V., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V.** 1999 “Alkaline Protease Inhibitor: A Novel Class of Antifungal Proteins against Phytopathogenic Fungi”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262(3): 702-707.

**Vicente-franqueira, R. O., Moreno, M. A., Leal, F. and Calera, J. A.** 2005 “The *zrfA* and *zrfB* Genes of *Aspergillus fumigatus* Encode the Zinc Transporter Proteins of a Zinc Uptake System Induced in an Acid, Zinc-Depleted Environment”, *Eukaryotic Cell* 4(5): 837-848.

**Vikram, A., Lui, L. H., Hossain, A. and Kushalappa, A. C.** 2006 “Metabolic fingerprinting to discriminate diseases of stored carrots”, *Annals of Applied Biology* 148(1): 17-26.

**Visser, M., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. and Viljoen, A.** 2004 “Transformation of *Fusarium oxysporum* f sp *cubense* causal agent of *Fusarium* wilt of banana with the green fluorescent protein GFP gene “, *Australasian Plant Pathology* 33(1): 69-75.

**Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M. and Mendgen, K.** 2001 “The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(14): 8133-8138.

**Vogel, J. P., Raab, T. K., Schiff, C. and Somerville, S. C.** 2002 “*PMR6*, a Pectate Lyase Like Gene Required for Powdery Mildew Susceptibility in *Arabidopsis*”, *The Plant Cell Online* 14(9): 2095-2106.

**Vrko, P. Ľ., Valterova, I., Vrko, J. and Koutek, B. Ľ.** 2000 “Volatiles released from oak, a host tree for the bark beetle *Scolytus intricatus*”, *Biochemical Systematics and Ecology* 28(10): 933-947.

**Wagener, J., Echtenacher, B., Rohde, M., Kotz, A., Krappmann, S., Heesemann, J. r. and Ebel, F.** 2008 “The Putative alpha 1,2-Mannosyltransferase AfMnt1 of the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Is Required for Cell Wall Stability and Full Virulence”, *Eukaryotic Cell* 7(10): 1661-1673.

**Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kamper, J. R. and Sauer, N.** 2010 “A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*”, *PLoS Biol* 8(2): e1000303.

**Walti, M. A., Villalba, C., Buser, R. M., Grunler, A., Aebi, M. and Kunzler, M.** 2006 “Targeted Gene Silencing in the

Model Mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) by Expression of Homologous Hairpin RNAs", *Eukaryotic Cell* 5(4): 732-744.

**Walton, J. D.** 1994 "Deconstructing the Cell Wall", *Plant Physiology* 104(4): 1113-1118.

**Walz, A., Theisen, S., and Zingen-Sell, I.** 2008 "Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*." *European Journal of Plant Pathology* 120(4): 317-330

**Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M., Guo, Y., He, M., Zhang, Y. and Pan, L.** 2010 "Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing", *Nucleic Acids Research* 38(15): 5075-5087.

**Wang, J. Y. and Li, H. Y.** 2008 "Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*", *Journal of Zhejiang University* 9(10): 823-828.

**Wang, X., Sun, L., Lin, T., Zhang, Z. and Ma, H.** 2012 "PdMfs1, a major facilitator superfamily transporter from *Penicillium digitatum*, is partially involved in the imazalil-resistance and pathogenicity", *African Journal of Microbiology Research* 6(1): 95-105.

**Wang, Y., Yang, L., Xu, H., Li, Q., Ma, Z. and Chu, C.** 2005 "Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*", *PROTEOMICS* 5(17): 4496-4503.

**Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M.** 2009 "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics", *Nat Rev Genet* 10(1): 57-63.

**Wang, Q. and P. J. Szanislo** 2009. "Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*." *Fungal Genetics and Biology* 46(9): 657-666.

**Wasmann, C. and VanEtten, H. D.** 1996 "Transformation-mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decrease the virulence of *Nectria haematococca* on pea", *Mol. Plant-Microbe Interact* 9: 793-803.

**Wei, J., Shih, J., Li, P., and Goodwin, H.** 2002 "Two pectin lyase genes, *pnl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*.", *Microbiology* 148.

**Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P. C. and Brakhage, A. A.** 1998 "Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the pyrG gene encoding orotidine 5"-monophosphate decarboxylase", *Current Genetics* 33(5): 378-385.

**Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A. and Ridgway, H. J.** 2006 "Approaches to functional genomics in filamentous fungi", *Cell Res* 16(1): 31-44.

**Wevelsiep, L., Ruppig, E. and Knogge, W.** 1993 "Stimulation of Barley Plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase by Phytotoxic Peptides from the Fungal Pathogen *Rhynchosporium secalis*", *Plant Physiology* 101(1): 297-301.

**Whiteside, J.O., Garnsey, S. M. and Timmer, L. W.** 1993 *Compendium of citrus diseases*, St Paul, MN, EE UU: APS Press.

**Wild, B. L.** 1994 "Differential sensitivity of citrus green mould isolates (*Penicillium digitatum* Sacc.) to the fungicide imazalil", *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 22(2): 167-171.

**Wilkie, K. C.** 1979 "The hemicelluloses of grasses and cereals.", *The hemicelluloses of grasses and cereals*. 36: 215-264.

**Williams, B., Kabbage, M., Kim, H. J., Britt, R. and Dickman, M. B.** 2011 "Tipping the Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment", *PLoS Pathog* 7(6): e1002107.

**Williams, H. L., Tang, Y. and Hintz, W. E.** 2002 "Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*", *Fungal Genetics and Biology* 36(1): 71-83.

**Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and Van Kan, J. A. L.** 2007 "*Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease", *Molecular Plant Pathology* 8(5): 561-580.

- Willger, S. D., Grahl, N., Cramer, R. A. Jr.** 2009 "Aspergillus fumigatus metabolism: Clues to mechanisms of in vivo fungal growth and virulence." *Medical Mycology* 47(s1): S72-S79.
- Wills, R. B. H., Ku, V. V. V., Shoket, D. and Kim, G. H.** 1999 "Importance of low ethylene levels to delay senescence of non-climacteric fruit and vegetables", *Aust. J. of Exp. Agric.* 39: 221-224
- Wilson, C. L. and Chalutz, E.** 1989 "Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria", *Scientia Horticulturae* 40(2): 105-112.
- Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E.** 1989 "Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology\*", *Annual Review of Phytopathology* 27(1): 425-441.
- Wilson, C. L. Wisniewski, M. E.** 1994 "Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables - Theory and practice" *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables - Theory and practice*, Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Winnenburg, R., Urban, M., Beacham, A., Baldwin, T.K., Holland, S., Lindeberg, M., Hansen, H., Rawlings, C., Hammond-Kosack, K. and Köhler, J.** 2008. "PHI-base update: additions to the pathogen host interactions database". *Nucleic Acids Research* 36 (Database Issue): D572-6
- Wit, P. J. G. M.** 2007 "How plants recognize pathogens and defend themselves", *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(21): 2726-2732.
- Wolpert, T. J., Dunkle, L. D. and Ciuffetti, L. M.** 2002 "Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a Name?", *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 251-285.
- Wolpert, T. J., Macko, V., Acklin, W., Jaun, B., Seibl, J., Meili, J. and Arigoni, D.** 1985 "Structure of victorin C, the major host-selective toxin from *Cochliobolus victoriae*", *Cellular and Molecular Life Sciences* 41(12): 1524-1529.
- Wong, G. K., Griffith, S., Kojima, I. and Demain, A. L.** 1998 "Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, polyrapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin", *J. Antibiot* 51: 487-491.
- Wood, H. M., Dickinson, M. J., Lucas, J. A. and Dyer, P. S.** 2001 "Cloning of the CYP51 gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme", *Fems Microbiology Letters* 196(2): 183-187.
- Wright, J., Sugden, D., Francis-McIntyre, S., Riba-Garcia, I., Gaskell, S., Grigoriev, I., Baker, S., Beynon, R. and Hubbard, S.** 2009 "Exploiting proteomic data for genome annotation and gene model validation in *Aspergillus niger*", *BMC Genomics* 10(1): 61.
- Wu, S. C., Ham, K. S., Darvill, A. G. and Albersheim, P.** 1997 "Deletion of Two Endo-beta-1,4-Xylanase Genes Reveals Additional Isozymes Secreted by the Rice Blast Fungus", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(6): 700-708.
- Wu, T. S. and Linz, J. E.** 1993 "Recombinational inactivation of the gene encoding nitrate reductase in *Aspergillus parasiticus*", *Appl. Environ. Microbiol.* 59(9): 2998-3002.
- Wubben, J. P., ten Have, A., van Kan, J. A. L. and Visser, J.** 2000 "Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression", *Current Genetics* 37(2): 152-157.
- Wyand, R. A. and Brown, J. K. M.** 2005 "Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides", *Fungal Genetics and Biology* 42(8): 726-735.
- Wyss, M. and Kaddurah-Daouk, R.** 2000 "Creatine and Creatinine Metabolism." *Physiological Reviews* 80(3): 1107-1213.
- Xiong, L., Lee, M. W., Qi, M. and Yang, Y.** 2001 "Identification of Defense-Related Rice Genes by Suppression Subtractive Hybridization and Differential Screening", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(5): 685-692.
- Xu, J. R.** 2000 "MAP Kinases in Fungal Pathogens", *Fungal Genetics and Biology* 31(3): 137-152.
- Xu, J. R. and Hamer, J. E.** 1996 "MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*", *Genes & Development* 10(21): 2696-2706.

- Xu, J. R., Urban, M., Sweigard, J. A. and Hamer, J. E. 1997 "The CPKA Gene of *Magnaporthe grisea* Is Essential for Appressorial Penetration", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(2): 187-194.
- Xue, T., Nguyen, C. K., Romans, A. and May, G. S. 2004 "A Mitogen-Activated Protein Kinase That Senses Nitrogen Regulates Conidial Germination and Growth in *Aspergillus fumigatus*", *Eukaryotic Cell* 3(2): 557-560.
- Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, N. T., Dinoor, A., Pines, O. and Prusky, D. 2001 "*Colletotrichum gloeosporioides pelB* Is an Important Virulence Factor in Avocado Fruit-Fungus Interaction", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(8): 988-995.
- Yakoby, N., Kobiler, I., Dinoor, A. and Prusky, D. 2000 "pH Regulation of Pectate Lyase Secretion Modulates the Attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avocado Fruits", *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1026-1030.
- Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, D. T., Dinoor, A., Pines, O. and Prusky, D. 2001 "*Colletotrichum gloeosporioides pelB*, encoding pectate lyase, is a key gene in fungal-fruit interactions", *Mol. Plant-Microbe Interact* 14: 988-995.
- Yamada, O., Ikeda, R., Ohkita, Y., Hayashi, R., Sakamoto, K. and Akita, O. 2007 "Gene Silencing by RNA Interference in the Koji Mold *Aspergillus oryzae*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(1): 138-144.
- Yamauchi, J., Takayanagi, N., Komeda, K., Takano, Y. and Okuno, T. 2004 "cAMP-PKA Signaling Regulates Multiple Steps of Fungal Infection Cooperatively with Cmk1 MAP Kinase in *Colletotrichum lagenarium*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(12): 1355-1365.
- Yang, Z. and Dickman, M. B. 1999 "*Colletotrichum trifolii* Mutants Disrupted in the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase Are Nonpathogenic", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(5): 430-439.
- Yin, Y., Liu, X., Li, B. and Ma, Z. 2009 "Characterization of Sterol Demethylation Inhibitor-Resistant Isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* Collected from Wheat in China", *Phytopathology* 99(5): 487-497.
- You, B. J., Choquer, M. and Chung, K. R. 2007 "The *Colletotrichum acutatum* Gene Encoding a Putative pH-Responsive Transcription Regulator Is a Key Virulence Determinant During Fungal Pathogenesis on Citrus", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(9): 1149-1160.
- You, B. J. and Chung, K. R. 2007 "Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway", *Fems Microbiology Letters* 277(1): 107-114.
- Young, C., Itoh, Y., Johnson, R., Garthwaite, I., Miles, C. O., Munday-Finch, S. C. and Scott, B. 1998 "Paxilline-negative mutants of *Penicillium paxilli* generated by heterologous and homologous plasmid integration", *Current Genetics* 33(5): 368-377.
- Yu, H. Y., Seo, J. A., Kim, J. E., Han, K. H., Shim, W. B., Yun, S. H. and Lee, Y. W. 2008 "Functional analyses of heterotrimeric G protein G alpha and G beta subunits in *Gibberella zeae*", *Microbiology* 154(2): 392-401.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y. and Scazzocchio, C. 2004 "Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi", *Fungal Genetics and Biology* 41(11): 973-981.
- Yuen, C. M. C., Paton, J. E., Hanawati, R. and Shen L. Q. 1995 "Effects of Ethanol, Acetaldehyde and Ethyl Formate Vapour on the Growth of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* on Oranges", *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 70: 81-84.
- Zeng, K., Cao, J. and Jiang, W. 2006 "Enhancing disease resistance in harvested mango (*Mangifera indica* L. cv. 'matisu') fruit by salicylic acid", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(5): 694-698.
- Zhang, A., Lu, P., hl-Roshak, A. M., Pareess, P. S., Kennedy, S., Tkacz, J. S. and An, Z. 2003 "Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea iozoyeasis*", *Mol Genet Genomics* 268(5): 645 - 655.
- Zhang, D., Fan, F., Yang, J., Wang, X., Qiu, D. and Jiang, L. 2010 "FgTep1p is linked to the phosphatidylinositol-3 kinase signalling pathway and plays a role in the virulence of *Fusarium graminearum* on wheat", *Molecular Plant Pathology* 11(4): 495-502.

- Zhang, H. Y., Fu, C. X., Zheng, X. D. and He, D. 2004 "Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit", *Botanical Studies* 45: 159-164.
- Zhang, L., Yang, J., Niu, Q., Zhao, X., Ye, F., Liang, L. and Zhang, K. Q. 2008 "Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein", *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(6): 983-990.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S. and Xu, J.-R. 2002 "Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* os-2 Gene Encodes a HOG1 Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue", *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 532-538.
- Zhang, Y. 2008 "I-TASSER server for protein 3D structure prediction", *BMC Bioinformatics* 9(1): 40.
- Zhang, Z. and Gurr, S. J. 2001 "Expression and sequence analysis of the *Erysiphe graminis* mitogen-activated protein kinase genes, *mpk1* and *mpk2*.", *Gene* 266: 57-66.
- Zhang, Z. and Townsend, J. P. 2010 "The filamentous fungal gene expression database (FFGED)", *Fungal Genetics and Biology* 47(3): 199-204.
- Zhang, P., Xu, B., Wang, Y., Li, Y., Qian, Z., Tang, S., Huan, S. and Ren, S. 2008 "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii*." *Mycological Research* 112(8): 943-949.
- Zhao, L., Liu, D., Zhang, Q., Zhang, S., Wan, J. and Xiao, W. 2007 "Expression and homology modeling of sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Penicillium digitatum*", *FEMS Microbiology Letters* 277(1): 37-43.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G. and Xu, J. R. 2005 "A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Regulating Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe grisea*", *The Plant Cell Online* 17(4): 1317-1329.
- Zhao, X. and Xu, J. R. 2007 "A highly conserved MAPK-docking site in Mst7 is essential for Pmk1 activation in *Magnaporthe grisea*", *Molecular Microbiology* 63(3): 881-894.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. and Xu, J. R. 2000 "The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(7): 724-732.
- Zheng, X. F., Kobayashi, Y. and Takeuchi, M. 1998 "Construction of a low-serine-type-carboxypeptidase-producing mutant of *Aspergillus oryzae* by the expression of antisense RNA and its use as a host for heterologous protein secretion", *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(1): 39-44.
- Zhou, J., Wang, Y. H., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zhang, S. L. and Yin, P. 2008 "Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14", *Bioresource Technology* 99(15): 6826-6833.
- Zhou, J., Zheng, X. Z., Lan, L., Lin, C. Z., Wu, Y. B., Lin, X. J., Ebbole, D., Lu, G. D. and Wang, Z. H. 2008 "Biochemical and molecular characterization of a putative endoglucanase in *Magnaporthe grisea*", *Current Genetics* 53(4): 217-224.
- Zhu, J. W., Xie, Q. Y. and Li, H. Y. 2006 "Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism", *Journal of Zhejiang University - Science A* 7(0): 362-365.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T. and Felix, G. 2006 "Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation", *Cell* 125(4): 749-760.
- Zwiers, L. H. and De Waard, M. A. 2000 "Characterization of the ABC Transporter Genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*", *Fungal Genetics and Biology* 30(2): 115-125.

