

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE
POLIGALACTURONASAS DE “FUSARIUM OXYSPORUM”
f.sp. “RADICIS LYCOPERSICI” Y SU ANÁLISIS EN
SISTEMAS HETERÓLOGOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aitor de las Heras Gutiérrez

Bajo la dirección de las doctoras

María Teresa González Jaén
Covadonga Vázquez Estévez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2471-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE
POLIGALACTURONASAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp.
radicis lycopersici Y SU ANÁLISIS EN SISTEMAS
HETERÓLOGOS.**

TESIS DOCTORAL

AITOR DE LAS HERAS GUTIÉRREZ

MADRID, 2004

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE
POLIGALACTURONASAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp.
radicis lycopersici Y SU ANÁLISIS EN SISTEMAS
HETERÓLOGOS.**

**Tesis doctoral presentada por
Aitor de las Heras Gutiérrez para optar al
grado de Doctor en Biología por la
Universidad Complutense de Madrid.**

Directoras:

**Dra María Teresa González Jaén
Profesora Titular de
la Universidad
Complutense de Madrid.**

**Dra. Covadonga Vázquez Estévez
Profesora Titular de
la Universidad
Complutense de Madrid.**

MADRID, 2004

“ Cuanto más comprensible parece el universo, tanto más desprovisto de sentido parece también. Pero si no hay consuelo en los frutos de la ciencia, hay al menos cierto consuelo en la ciencia misma [...] El esfuerzo por entender el universo es una de las muy escasas cosas que eleva la vida humana un poco por encima del nivel de la farsa y le confiere algo de la grandeza de la tragedia”

Steven Weinberg, 1977

“Mejor morir que perder la vida”
Daniel Gutiérrez

A mis padres y hermanos.
Y a la memoria de dos personas especiales, mi abuelo y “El Brujo”. Al primero por vencer
en el juego de azar de la vida y al último por no poder hacerlo. Mi más profundo respeto
por los dos.

ABREVIATURAS

A	adenina
Alanina	Ala/ A
Arginina	Arg/ R
Asparagina	Asn / N
Aspartato	Asp/ P
C	citosina
Cisteína	Cys/ C
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
ENDOPG	endopoligalacturonasa
EXOPG	exopoligalacturonasa
Fenilalanina	Phe / F
FOL	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
FORL	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i>
G	guanina
Glicina	Gly/ G
Glutámico	Glu/ E
Glutamina	Gln/ Q
Histidina	His/ H
Isoleucina	Ile/ I
LB	bacto-triptona +extracto de bacto levadura+cloruro sódico
LBA	LB+ ampicilina
Leucina	Leu / L
Lisina	Lys/ K
Mb	megabases
Meteonina	Met/ M
N	A/T/C/G
Pb	pares de bases.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	patata dextrosa agar
PG	poligalacturonasa
PGIP	proteína inhibidoras de poligalacturonasas
pl	punto isoeléctrico
Prolina	Pro/ P
Pu ó R	purina
Py o Y	pirimidina
RAPDs	polimorfismos de DNAs amplificados al azar
RFLPs	polimorfismos en longitudes de fragmentos de restricción
RNAse	ribonucleasa
RT-PCR	transcripción inversa -Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	dodecil-sulfato sódico
Serina	Ser/ S
T	timina
TAE	tris acético EDTA

Tirosina	Tyr / Y
Treonina	Thr/ T
Triptófano	Trp/ W
Ufp	unidades formadoras de placas
Valina	Val/ V
YNB	yeast nitrogen base

INTRODUCCIÓN	1
El género <i>Fusarium</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	12
Las fusariosis del tomate	17
La pectina	21
Enzimas pécticas	26
Poligalacturonasas	28
Objetivos del trabajo	37
<u>CAPÍTULO 1: Caracterización de genes codificadores de PGs en FORL</u>	39
INTRODUCCIÓN	40
MATERIAL Y MÉTODOS	41
Material biológico	41
Medios y condiciones de cultivo	42
Obtención del DNA genómico	42
Electroforesis de DNA	43
Obtención de sondas específicas de poligalacturonasas	44
Reacciones de amplificación.....	44
Clonación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.....	44
Preparación y marcaje de las sondas.....	46
Escrutinio de la genoteca genómica	46
Preparación de células bacterianas.....	46
Infección de las células bacterianas con los fagos.....	47
Transferencia de los fagos a membranas de nylon.....	47
Hibridación de los filtros con sondas de poligalacturonasas.....	47
Escrutinio de la genoteca con cada una de las sondas de PGs obtenidas.....	48
Titulación y amplificación de los fagos positivos.....	50
Obtención de las secuencias genómicas de los genes de PGs	51
Extracción de DNA de los fagos positivos.....	51
Digestión del DNA de los fagos.....	51
Transferencia de DNA.....	53
Hibridaciones y detección de bandas positivas.....	53
Subclonaje de las bandas positivas.....	54
Obtención de las secuencias del cDNA	54
Medios de cultivo y obtención del RNA.....	54
Transcripciones inversas (RT-PCR).....	55
Análisis de secuencias	56
RESULTADOS	57
Obtención de sondas de genes codificadores de PGs	57
Aislamiento y caracterización de las secuencias de nucleótidos de cuatro genes de PGs de FORL	58
Caracterización del gen <i>pgx2</i>	58
Caracterización del gen <i>pgx1</i>	61
Caracterización del gen <i>pg1</i>	64
Caracterización del gen <i>pg2</i>	66
Análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos de las cuatro PGs de FORL	69
Comparación de las secuencias de aminoácidos de las cuatro PGs de FORL	72
Análisis de la estructura terciaria de las PGs de FORL	74
DISCUSIÓN	77
Análisis de las secuencias de nucleótidos de las cuatro PGs de FORL	77
Comparación de las secuencias de aminoácidos de las cuatro PGs de FORL	81
Análisis de la estructura terciaria de las PGs de FORL	82
<u>CAPÍTULO 2: Variabilidad y relación evolutiva de las PGs</u>	85

INTRODUCCIÓN.....	86
MATERIAL Y MÉTODOS	87
Material biológico y cultivos	87
Extracción de ácidos nucleicos y electroforesis de DNA	88
Obtención de las secuencias parciales de <i>pgx1</i> y <i>pgx2</i>	88
Secuencias utilizadas presentes en el Genbank.....	89
Análisis de secuencias	89
RESULTADOS	90
Comparación de secuencias parciales de exopoligalacturonas en distintos aislamientos del género <i>Fusarium</i>	90
Comparación de las PGs de FORL con otras poligalacturonas descritas.....	94
DISCUSIÓN	96
Comparación de secuencias parciales de EXOPGs en distintos aislamientos del género <i>Fusarium</i>	96
Comparación de las PGs de FORL con otras poligalacturonas descritas.....	98
CAPÍTULO 3: Control genético de las PGs de FORL	101
INTRODUCCIÓN.....	102
MATERIAL Y MÉTODOS	103
Material biológico y cultivos	103
Extracción de ácidos nucleicos	104
Electroforesis en geles de agarosa	105
Digestiones con enzimas de restricción.....	106
Hibridación tipo <i>Southern</i>	106
Hibridaciones tipo <i>northern</i>	106
RESULTADOS	107
Determinación del número de copias de los genes <i>pg2</i> y <i>pgx1</i>	107
Estudio de la expresión de los genes <i>pg1</i> , <i>pg2</i> , <i>pgx1</i> y <i>pgx2</i> en cultivos <i>in vitro</i>	110
DISCUSIÓN	116
Determinación del número de copias de los genes <i>pg2</i> y <i>pgx1</i>	116
Estudio de la expresión de los genes <i>pg1</i> , <i>pg2</i> , <i>pgx1</i> y <i>pgx2</i> en cultivos <i>in vitro</i>	118
CAPÍTULO 4:	121
INTRODUCCIÓN.....	122
MATERIAL Y MÉTODOS	124
Análisis de secuencias promotoras	124
Material biológico	124
Medios y condiciones de cultivo	124
Medida del crecimiento.....	125
Obtención de vectores.....	125
Transformación de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mat α , <i>ura3</i> - Δ , <i>trp1</i> -4.....	128
Obtención de muestras para los ensayos de β -galactosidasa.....	129
Ensayo para la valoración de actividad β -galactosidasa.....	129
RESULTADOS	130

Análisis de las regiones promotoras de los cuatro genes codificadores de poligalacturonasas de FORL.....	130
Análisis funcional de los promotores de los genes PGs de FORL en <i>S. cerevisiae</i>	134
DISCUSIÓN	138
Análisis de las regiones promotoras de los cuatro genes codificadores de poligalacturonasas de FORL.....	138
Análisis funcional de los promotores de los genes PGs de FORL en <i>S. cerevisiae</i>	143
<u>CAPÍTULO 5: Expresión heteróloga de PGX1 y PGX2 en <i>P. pastoris</i></u>	146
INTRODUCCIÓN	147
MATERIAL Y METODOS	149
Material biológico y plásmidos	149
Construcción de los vectores de expresión pPIC α -pgx1 y pPIC α -pgx2	149
Transformación de las cepas de <i>Pichia pastoris</i>	151
Expresión piloto de los genes <i>pgx1</i> y <i>pgx2</i> en las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i>	153
Expresión a mayor escala del gen <i>pgx1</i> en las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i>	154
Diálisis de las muestras obtenidas de los cultivos	154
Proteínas en el líquido de cultivo.....	154
Valoración de la actividad PG de los cultivos	155
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	155
Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.....	157
Inmunodetección de las proteínas heterólogas.....	158
Determinación del pH óptimo y la estabilidad al pH de PGX1.....	158
Extracción de RNA.	159
RESULTADOS	159
Expresión de PGX2 en <i>P. pastoris</i>	159
Expresión de PGX1 en <i>P. pastoris</i>	161
Caracterización de PGX1	163
pH óptimo.....	163
Estabilidad al pH	164
Temperatura óptima.....	164
Estabilidad a la temperatura	165
Afinidad de PGX1 por distintos sustratos	166
DISCUSIÓN	167
Expresión de PGX2 en <i>P. pastoris</i>	167
Expresión de PGX1 en <i>P. pastoris</i> y caracterización enzimática de la proteína heteróloga	168
<u>CONCLUSIONES</u>	172
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	175

Introducción

El género *Fusarium*.

La importancia de los hongos filamentosos en multitud de procesos ha hecho que en los últimos 100 años su estudio haya crecido de una forma exponencial. En el ecosistema, son una parte fundamental de la cadena trófica y muchos de ellos producen enfermedades tanto en plantas de interés económico causando pérdidas de billones de dólares cada año (Carlile, *et al.*, 2001), como en el hombre y en especies animales. Por otro lado, el hombre se ha aprovechado a lo largo de la historia de su potencial como productores de sustancias de interés, como antibióticos y productos útiles para la alimentación. Además, debido a sus cortos ciclos de vida han sido utilizados con frecuencia como organismos experimentales.

Dentro de los hongos filamentosos el género *Fusarium* es, sin duda, uno de los más importantes. Fue definido por primera vez en la moderna terminología de sistema científico por Link (1809), aunque existían datos desde el siglo XVI basados en las descripciones de los Aztecas de la podredumbre que produce en el maíz una de las especies del género. Los primeros estudios sobre los problemas producidos por *Fusarium* comienzan con una investigación llevada a cabo por Martius (1842) a mediados del XIX, en los que fue establecido como el agente causal de la podredumbre en patatas almacenadas. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se descubrió su importancia como causante de enfermedades en plantas y productor de toxinas. Los primeros estudios demostrando la patogenicidad de *Fusarium* en plantas vivas se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1984).

La clasificación realizada por Link utilizó como principal criterio la forma de los conidios, a los que describió como fusiformes e hialinos. Posteriormente, Fries (1821) revisó el concepto incluyéndolo en el orden *Tuberculariaceae*. Durante todo el siglo XX muchos autores han intentado establecer un buen criterio para definir el género. Booth en 1982 establece que lo único que se puede decir a este nivel es que *Fusarium* es básicamente un género con esporas asexuales hialinas, septadas y cuya célula basal lleva una

característica estructura de “tacón”. En los años ochenta Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983) combinando aspectos de anteriores trabajos desarrollan sistemas taxonómicos basados en características morfológicas, que permiten distinguir entre especies de una forma razonablemente segura (Figura I.1). El sistema de Nelson ha sido ampliamente utilizado fundamentalmente debido a su facilidad de manejo, en él propone la existencia de doce secciones que agrupan todas las especies del género.

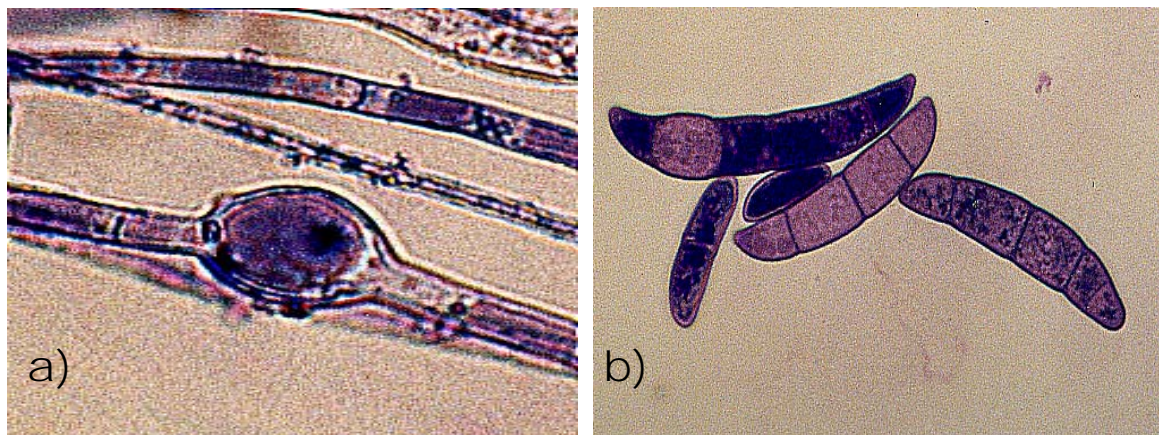


Figura I.1: a) Clamidospora y b) conidios de *Fusarium* spp.

En los últimos años, con el desarrollo de las técnicas de genética molecular se ha comprobado que existe una gran heterogeneidad entre especies del género (Seifert y Gams, 2001). Tradicionalmente, para la identificación de las distintas especies, se habían utilizado tanto las diferencias en la forma de los macroconidios como otros caracteres morfológicos. Desgraciadamente tanto en el caso de *Fusarium* como en otras especies de hongos filamentosos el número de caracteres morfológicos con valor taxonómico son pocos, fácilmente malinterpretados y además están sujetos a cambios en función de condiciones ambientales (Leslie, *et al.*, 2001). Tal vez sea debido a esto que la taxonomía de *Fusarium* haya sufrido numerosos cambios a lo largo de estos últimos 100 años.

Otro factor importante en la clasificación de hongos filamentosos es la reproducción. Los hongos con formas anamórficas, conocidos también como Deuteromicetos u hongos imperfectos en los que se han incluido las formas

asexuales de muchas especies de hongos filamentosos, se clasifican en base a su morfología asexual aunque se les conozca forma teleomórfica (sexual) (Carlile, *et al.*, 2001), hecho que sólo ocurre para el 5 % de las especies anamórficas descritas (Seifert y Gams, 2001). Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual, como *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual. Este hecho complica la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Especies del género *Fusarium*, situado dentro de los hongos anamórficos, se corresponden a las formas sexuales del orden *Hipocreales*. Este orden se sitúa dentro de los Pirenomicetos, un grupo descriptivo más que un término taxonómico real aunque la mayoría de los hongos pertenecientes a este grupo formen probablemente un grupo monofilético (Samuels y Blackwell, 2001). Los principales géneros en los que se agrupan las formas teleomórficas de *Fusarium* son *Gibberella*, y algunos géneros segregados de *Nectria*.

A pesar de la ausencia de reproducción sexual en parte de las especies del género *Fusarium*, en algunas especies asexuales como *F. oxysporum* sí han sido descritos fenómenos de intercambio genético como la heterocariosis y la parasexualidad (Burnett, 1984). La heterocariosis es un fenómeno por el cual los hongos haploides, como es el caso de *Fusarium*, pueden obtener los beneficios de la diploidía y se produce si tras la fusión de las hifas los núcleos no llegan a fusionarse y se mantienen por un periodo indefinido de tiempo, se habla entonces de heterocariontes vegetativos. Dos cepas capaces de formar un heterocarionte vegetativo, pertenecen a un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG), ésta en *Fusarium* está gobernada por al menos diez *loci* denominados *vic*. La presencia de los mismos alelos en cada uno de estos *loci* permite la formación heterocarionte estable, en el caso de una fusión incompatible, se produciría la muerte de la célula (Leslie, 1993). No habría que descartar, no obstante, que en los heterocariontes vegetativos se produzcan fenómenos de intercambio genético, recientemente se ha observado que mediante la fusión de protoplastos de dos cepas del anamorfo *F. oxysporum* se

producían reorganizaciones cromosómicas y recombinación entre el material genético de los parentales (Teunissen, *et al.*, 2002).

En las especies con reproducción sexual se produce la fusión de los núcleos generando un núcleo diploide que entrará en meiosis. Las bases genéticas de los mecanismos que controlan los fenómenos de reproducción sexual en los ascomicetos filamentosos han sido esclarecidas en los últimos años. Los productos de los genes denominados *mating-type* son los encargados de regular la reproducción sexual, su modo de acción exacto aún no se conoce pero dada la presencia de dominios de unión al DNA en las proteínas codificadas por ellos podrían ser factores de transcripción (Coppin, *et al.*, 1997). Estos genes determinan la habilidad de dos cepas para fusionar sus núcleos y formar una célula diploide (Nelson, 1996). En la mayoría de los ascomicetos los *mating-type* están determinados por dos únicos alelos de un solo *locus*, además presentan un baja similitud en su secuencia y a diferencia de las levaduras, no existen copias adicionales de estas secuencias fuera del *locus* (Coppin, *et al.*, 1997). Estudios recientes demuestran que los genes *mating-type* están presentes en las formas asexuales del complejo *Fusarium/Gibberella*, su estructura es idéntica a la presente en los aislamientos sexuales y se ha observado que, al igual que en éstas, estos genes se expresan (Yun, *et al.*, 2000).

En los últimos años las técnicas de análisis de DNA han permitido abordar desde un nuevo punto de vista el problema de la variabilidad de las especies de hongos filamentosos. Gracias a estas técnicas se han ido aportando nuevos datos que han contribuido, en muchos casos, a revisar la clasificación de las distintas especies. En *Fusarium* con el fin de determinar la variabilidad genética entre especies, así como, para identificar determinadas cepas patógenas, se han empleado marcadores moleculares como RAPDs (Voigt, *et al.*, 1995) o se han realizado análisis de las regiones intergénicas espaciadoras del rRNA mediante RFLPs (Mirete, *et al.*, 2003), o bien, mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos (Guadet, *et al.*, 1989). Recientemente han aparecido trabajos utilizando otras técnicas para identificar

cepas patógenas en los que se utilizan *arrays* de DNA (Lievens, *et al.*, 2003) o marcadores no moleculares como las isoenzimas (Laday y Szecsi, 2002).

Por otro lado, el desarrollo de estas técnicas también ha permitido el estudio de varios aspectos genéticos dentro de este género. Gracias a la electroforesis en campo pulsado ha sido posible determinar el número de cromosomas que presentan las especies del género *Fusarium*. Se ha observado que existe variabilidad tanto en el número como en el tamaño de los cromosomas entre distintas especies. Migheli *et al.* (1993) estipularon un número de cromosomas entre 7 y 11 para distintas especies del género, con un tamaño entre 0,6 y 6,7 Mb. Fekete *et al.* (1993) utilizando la misma técnica estimaron el tamaño del genoma de *Fusarium* entre 27 y 29,9 Mb. Un estudio reciente de distintas formas especiales de *F. solani* revela la presencia de entre 5 y 12 cromosomas de entre 0,6 y 5,7 Mb siendo el patrón de cromosomas similar entre cepas de las mismas formas especiales (Suga, *et al.*, 2002).

Se han obtenido también los mapas genéticos de dos especies diferentes de *Fusarium*. Combinando el cruzamiento de cepas mutantes y marcadores moleculares, Jurgenson, *et al.* (2002a) han obtenido un mapa genético de *F. graminearum*. Asimismo, han completado (Jurgenson, *et al.*, 2002b) mediante AFLPs el mapa genético de *F. verticillioides*. La existencia de estos mapas facilitará la caracterización de nuevos genes de interés, además de proporcionar una herramienta esencial para realizar estudios de poblaciones.

Como complemento al mapa genético de *F. graminearum* recientemente se ha completado la secuenciación del 90 % del genoma de esta especie, quedando al margen las secuencias altamente repetidas y los genes ribosómicos (GenBank Acces. AACM00000000). La iniciativa llevada a cabo por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), se ha realizado mediante la técnica de *Shotgun* y el programa Arachne (Jaffe, *et al.*, 2003) (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>). Este proyecto ha permitido realizar una estimación del tamaño del genoma de

la especie en 40 Mb además de proporcionar una herramienta muy útil para la detección y caracterización de nuevos genes.

Otro fenómeno que ha sido descrito en *Fusarium* gracias al avance de las técnicas de biología molecular y que, tal vez, tenga una gran importancia en la evolución del género, es la presencia de transposones. Los transposones se encuentran en casi todos los organismos, pero su presencia en hongos filamentosos había sido considerada extraña a pesar de que se había observado su abundancia en patógenos de plantas. En *F. oxysporum* se ha detectado la existencia de transposones pertenecientes a ocho familias de elementos móviles (Hua-Van, *et al.*, 2000). En cepas de *Fusarium* en las que habían ocurrido fenómenos de transposición se observó una gran variabilidad en los patrones de cariotipos, existiendo una correlación entre el elevado polimorfismo de los cromosomas y la concentración de elementos móviles (Daviere, *et al.*, 2001). Asimismo, se ha comprobado su relación con cambios en la expresión de algunos genes como en el caso del gen *niaD* cuya expresión se ve afectada por la transposición de *Fot1*, uno de los elementos móviles más comunes de *Fusarium*, que mediante su inserción genera transcritos truncados (Deschamps, *et al.*, 1999). Este fenómeno proporciona un nuevo mecanismo por el cual la expresión de genes en los hongos podría estar controlada. También se ha observado que los transposones de *Fusarium* pueden ser activos en genomas de hongos diferentes (de Queiroz y Daboussi, 2003).

Estos estudios resultan muy interesantes para el desarrollo de herramientas que permitan utilizar los transposones para detectar y clonar nuevos genes. La utilización de transposones ha permitido la obtención de un mapa mitótico de ligamiento de *F. oxysporum*. Dado el carácter asexual de la especie, el mapa se ha realizado en una población parasexual producto de fusiones de protoplastos. La utilización de AFLPs y de secuencias del transposon *Foxy* (Mes, *et al.*, 2000a), muy abundante en el genoma de *F. oxysporum* y altamente variable en su localización, permitieron realizar un mapa de ligamiento (Teunissen, *et al.*, 2003).

La transformación de las células fúngicas con DNA exógeno es también una técnica de gran utilidad para realizar estudios genéticos. En general se han desarrollado sistemas de transformación para la mayoría de los grupos de hongos filamentosos. Los primeros intentos de transformación fueron en *S. cerevisiae*, desarrollando un sistema en el que era necesario la preparación de protoplastos (Fincham, 1989). Posteriormente, esta técnica se aplicó a numerosos grupos de hongos filamentosos. Actualmente se han desarrollado otras técnicas para la transformación de hongos filamentosos como la electroporación, la transformación biolística (Ruiz-Diez, 2002) y la transformación por medio de *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot, *et al.*, 1998). A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* en donde existen secuencias autónomas replicativas (Broach, *et al.*, 1983) que permiten la construcción de vectores que permanecen fuera del genoma, en los hongos filamentosos, generalmente, el DNA introducido se tiene que integrar en el genoma para conseguir transformantes estables. La mayor parte de las integraciones son en regiones no homólogas (Ruiz-Diez, 2002) lo que dificulta el uso de la técnica para estudios de interrupción de genes.

En *Fusarium* existen referencias de transformación mediante la formación de protoplastos utilizando distintos tipos de marcadores tanto auxotróficos (Malardier, *et al.*, 1989) como de resistencia a drogas (Kistler y Benny, 1988). Se ha descrito la existencia de plásmidos lineales autorreplicativos en *F. oxysporum* al producirse una reorganización entre un vector introducido con secuencias propias del genoma del hongo que tenían elementos teloméricos y autorreplicativos (Powell y Kistler, 1990). Este fenómeno ha sido utilizado para obtener vectores que incrementen la eficacia de la transformación en *F. oxysporum* (García-Pedrajas y Roncero, 1996). A pesar de que se ha mejorado la eficacia en la transformación de *Fusarium* mediante protoplastos, este sistema puede resultar muy laborioso y sin garantía de éxito. Se ha visto que la utilización de *A. tumefaciens* para la transformación de hongos es 600 veces más eficaz que los métodos tradicionales (de Groot, *et al.*, 1998). Estudios recientes demuestran que en

Fusarium la transformación por medio de *A. tumefaciens* resulta eficaz y estable (Covert, *et al.*, 2001).

Como hemos visto, en los últimos tiempos se han desarrollado números trabajos que abordan el estudio del género *Fusarium* desde un punto de vista genético. Este interés por las especies de este género es debido a la importancia que tienen para el hombre, en parte debido a su distribución cosmopolita y la capacidad de muchas de ellas de producir enfermedades en especies vegetales. Representantes del género se han encontrado en la mayoría de las regiones geográficas, incluso en el desierto (Katan, 1971). Aunque existen especies que pueden tener una distribución cosmopolita, también existen otras especies, cuya distribución está limitada a uno o pocos cultivos, climas o zonas ecológicas (Leslie, *et al.*, 2001).

Fusarium agrupa especies que, generalmente, se encuentran en los suelos obteniendo los nutrientes del material orgánico y de las raíces de las plantas. El aporte de nutrientes al suelo suele desaparecer rápidamente debido a la presencia de numerosos microorganismos, por lo que, la mayoría de los hongos permanecen en estado durmiente mediante la formación de estructuras de resistencia. En el caso de *Fusarium*, algunas de sus especies forman clamidosporas, estructuras de resistencia que sólo en presencia de restos vegetales o raíces germinan (Price, 1984). Las clamidosporas pueden sobrevivir durante tiempos largos en condiciones poco favorables para el crecimiento del micelio.

De entre todas las especies de *Fusarium* más de la mitad son parásitos de plantas aunque existe una gran variabilidad en las formas de vida. Booth (1971) clasificó 43 especies de *Fusarium* dentro de varios grupos: patógenos de plantas (incluyendo los micoparásitos), patógenos de insectos y saprófitos. Por supuesto, existen algunas especies que se podrían situar en más de un grupo.

La importancia que tiene este género para el hombre, no sólo se debe a la presencia de muchos fitopatógenos, sino también, a que son la causa de problemas de podredumbre en productos de origen vegetal almacenados, a su condición de patógenos para el hombre y animales y, a su interés como productores tanto de toxinas como de metabolitos útiles para el hombre.

Aunque las infecciones en invertebrados son las más importantes producidas por *Fusarium* en animales, se han descrito micosis en diversos grupos de vertebrados como reptiles, anfibios, y mamíferos. Con respecto a las especies de *Fusarium* como agentes causantes de enfermedad en el hombre habría que decir que la mayoría de su actividad patogénica se debe a la producción de micotoxinas, ya que, no juegan un papel muy importante en las micosis humanas. Aún así, existen especies de *Fusarium* capaces de producir infecciones en el hombre en la piel y en el tejido ocular provocando graves efectos en la visión (Austwick, 1984) siendo su incidencia mayor en pacientes inmunodeprimidos.

Las toxinas, producidas por la mayoría de las especies del género (Bilgrami y Choudhary, 1998) son metabolitos secundarios que presentan una gran variabilidad en su estructura química. Durante las tres últimas décadas se ha desarrollado una intensa investigación sobre ellas, especialmente en las producidas por *Fusarium*, ya que, la contaminación de alimentos de la dieta tanto humana como animal ha generado grandes pérdidas económicas (Conkova, *et al.*, 2003; Wolf-Hall y Schwarz, 2002) además de producir efectos negativos para la salud crónicos y agudos. Se ha demostrado una correlación entre la ingestión de alimentos contaminados con fumonisinas, uno de los más importantes grupos de toxinas producidos por *Fusarium*, y la aparición de cánceres de esófago en poblaciones de África (Turner, *et al.*, 1999). Por ello, en los últimos tiempos se ha producido un aumento del control de los niveles de toxinas permitidos en los alimentos básicos, siendo evaluados por el Comité Mundial de la Salud y la FAO (FAO/WHO, 2001).

A pesar de que, como hemos visto, las especies del género son causa de numerosos problemas también han despertado interés debido al aprovechamiento por parte del hombre de determinados metabolitos. Existen proteínas producidas por especies del género *Fusarium* que son consumidas en diversos países de la comunidad económica europea. Tal es el caso de la micoproteína, nombre genérico para el producto alimenticio resultado de un proceso de fermentación continua de *F. venenatum* (Wiebe, 2002; Moore y Chiu, 2001).

La importancia de *Fusarium* como patógeno de plantas se ha puesto de manifiesto, debido a la dificultad a la hora de controlar las enfermedades que produce. Estos patógenos vegetales se pueden dividir en tres grupos en función del tipo de enfermedad que producen. Un primer grupo, cuyo representante principal es *F. oxysporum*, y cuyos integrantes provocan marchitamiento vascular en el huésped. En segundo lugar, estarían las podredumbres de raíz causadas principalmente por *F. solani* y por último las especies que provocan enfermedades en plantas gramíneas (*F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum*) (Price, 1984).

Debido a la severidad de las enfermedades producidas por *Fusarium* los métodos de control disponibles han demostrado ser ineficaces o difíciles de aplicar. Muchos fungicidas habían dado resultados positivos en cultivos *in vitro* sin embargo resultaron ineficaces cuando se aplicaron en el campo. Se probaron otros métodos de control biológico desarrollados a partir del descubrimiento de la existencia de suelos supresores de las vasculariosis producidas por *Fusarium*. Se pudo comprobar la existencia en esos suelos de cepas no patogénicas de *F.oxysporum* y cepas de *Pseudomonas fluorescens* cuya presencia e interacción producía el efecto supresor (Alabouvette, *et al.*, 1998). La eficacia de un control biológico de este tipo esta condicionada por la densidad de la población del microorganismo antagónico y además depende de las cepas, ya que no todas tienen la misma eficacia. Lemanceau y Alabouvette observaron que sólo el 10% de las cepas de *P. fluorescens* eran capaces de

mejorar el control biológico producido por una cepa de *Fusarium* no patogénica (Alabouvette, *et al.*, 1998).

De todos los métodos de control de las fusariosis, el que mejor resultado ha producido ha sido el desarrollo de cultivares resistentes a nuevas cepas de *Fusarium*. Un mejor entendimiento de los fenómenos de interacción entre el huésped y el patógeno ayudaría, sin duda, a la producción de nuevos cultivares resistentes.

Dentro de todas las especies del género, *F. oxysporum* ha sido objeto de numerosos estudios debido a su habilidad de producir enfermedades en muchas plantas de interés comercial.

Fusarium oxysporum.

Fusarium oxysporum Schlecht. es un hongo de reproducción asexual, haploide y con distribución cosmopolita, cuyos aislamientos se encuentran en suelos desde el desierto de Sonora hasta las selvas tropicales, tundra, bosques (Kistler, 2001), y en la mayoría de los suelos utilizados para la agricultura. Agrupa tanto aislamientos no patogénicos como patogénicos (Gordon y Okamoto, 1992) y sus aislamientos han sido clasificados dentro de la sección Elegans de las doce descritas por Nelson *et al.* (1983).

Sus formas patógenas se han estudiado durante más de cien años y parásitan alrededor de 100 especies de plantas incluyendo gimnospermas y angiospermas (Armstrong y Armstrong, 1981), aunque cada aislamiento patógeno tiene un rango de especies huésped bastante estrecho. Tradicionalmente se han utilizados criterios morfológicos tales como la forma de los macroconidios, la estructura del microconidióforo y la formación y disposición de las clamidosporas para definir esta especie. Aunque estos criterios hayan servido para definir la especie existe una gran variación tanto morfológica como fisiológica dentro de *F. oxysporum*, y es probable que la reciente acumulación de datos proporcionados por estudios moleculares

provocarán una revisión en la taxonomía de la especie (Gordon y Martyn, 1997).

Fusarium oxysporum tiene un ciclo de vida complejo que podría dividirse en dos fases, una como parásito dentro de su huésped específico y otra de crecimiento saprofito (Figura I.2).

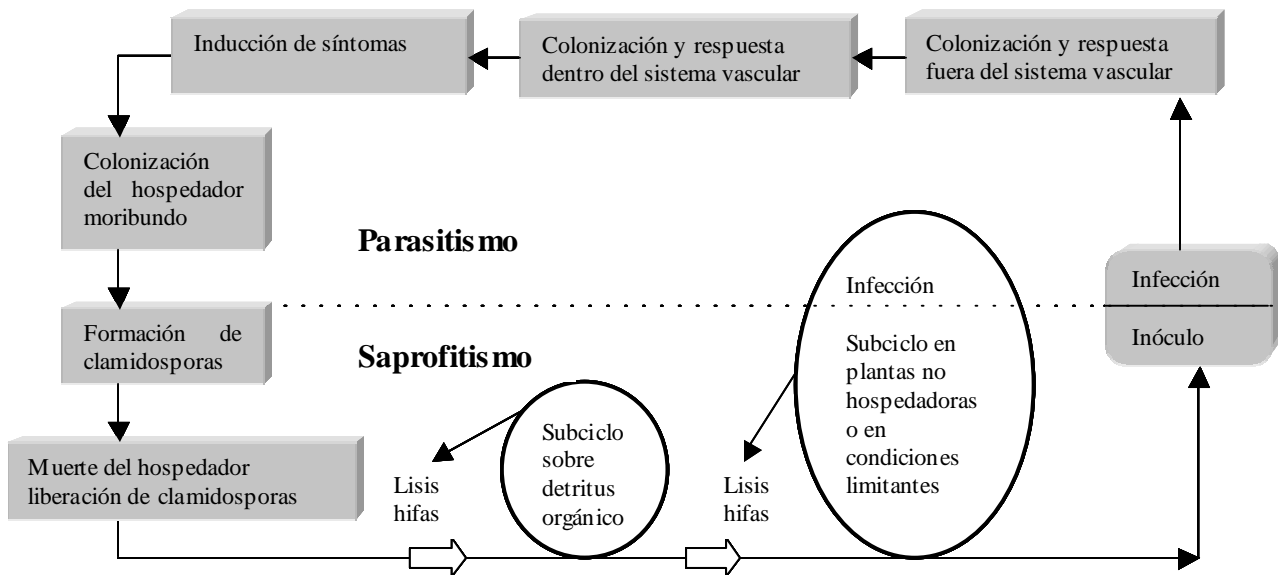


Figura I.2: Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* (Beckman, 1987).

La fase saprófita empieza cuando los tejidos infectados de la planta comienzan a morir. El hongo produce clamidosporas cuando los niveles de carbohidratos disminuyen en el tejido moribundo y son liberadas al suelo junto a restos de hifas cuando la planta muere (Beckman, 1987). Estas estructuras de resistencia sobreviven en forma durmiente durante largos períodos de tiempo ya que, su capacidad para perdurar en el suelo en condiciones desfavorables para el crecimiento del micelio es alta (Price, 1984).

Si las condiciones fuesen favorables para el hongo, pueden germinar y el hongo comenzara su fase de vida saprofito. La germinación de las clamidosporas, que se produce en presencia de restos vegetales o un huésped apropiado, puede ser un proceso rápido. Además, las clamidosporas germinadas son capaces de producir nuevas clamidosporas con reservas

frescas lo que permite la persistencia en el suelo del patógeno. Este hecho dificulta la tarea de erradicar la enfermedad de los cultivos, por lo que, resulta de gran importancia el desarrollo de tratamientos y técnicas agrícolas para minimizar la presencia de inóculos en el suelo.

Como hemos dicho cuando las clamidosporas germinan sobre residuos vegetales presentes en el suelo se produce el desarrollo de la fase saprofita del hongo. Igualmente, ante la proximidad de raíces el estado de dormancia de las clamidosporas es interrumpido y el hongo colonizará la planta pudiendo producir la infección del huésped y entrar en la fase parásita, o bien, si el huésped no es el apropiado continuar como saprofito.

F. oxysporum es un colonizador agresivo y competitivo en comparación con otras especies de hongos filamentosos (Beckman, 1987), es capaz de penetrar en el tejido cortical externo de la raíz a través de las puntas de las raíces o de heridas. En esta primera fase se determinará el éxito o fracaso del patógeno para entrar en el sistema vascular. Las cepas no patogénicas son capaces de colonizar la raíz pero no desencadenan la enfermedad debido a que son incapaces de penetrar en el sistema vascular de la planta, debido a una eficaz combinación de interacciones celulares, refuerzo de determinadas estructuras del tejido de la planta y las respuestas de defensa de la planta (Beckman, 1987). Esto último ocurre cuando el hongo penetra dentro de un huésped no específico, en donde permanecerá y formará nuevas clamidosporas, aumentando su capacidad de persistencia en los suelos.

Cuando penetra en una planta susceptible se desencadena la segunda fase del ciclo de vida parásita. El hongo invade el tejido xilemático y se extiende rápidamente mediante el crecimiento de las hifas y la producción de esporas, ya que, éstas pueden ser arrastradas a través los vasos de la planta con mayor facilidad.

La fase tercera de la enfermedad se produce cuando comienzan la aparición de síntomas de la planta. Existe controversia acerca de los

mecanismos que desencadenan la aparición de los síntomas, ya que, pueden deberse a la obstrucción del sistema vascular de la planta, o bien, a la producción de toxinas (MacHardy y Beckman, 1981). Además numerosos factores ambientales tales como, la temperatura, la luz, la aireación y humedad del suelo, la presencia de calcio y nitrógeno, el pH y la microflora presente en el suelo serán determinantes para que se desencadene la enfermedad.

Un problema importante a la hora de estudiar la biología de un patógeno como *F. oxysporum* es la dificultad de definir qué es una población al no existir criterios morfológicos que permitan la diferenciación a nivel intraespecífico. Para intentar ordenar y explicar toda esta variabilidad se utilizan los conceptos de formas especiales, razas patogénicas y grupos de compatibilidad vegetativa (VCG).

Las formas especiales (f.sp) (Deighton, *et al.*, 1962), son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedadores. Serían, por lo tanto, un conjunto de cepas que atacan a una especie vegetal o a lo sumo a varias especies de un mismo género Aunque también este concepto se usa para definir cepas que producen una patología diferente aunque parasiten a la misma especie vegetal. Esta definición se refiere fundamentalmente a capacidades fisiológicas del hongo y no tiene un valor taxonómico pero tradicionalmente ha sido un concepto útil para los fitopatólogos (Gordon y Martyn, 1997).

La nomenclatura utilizada para designar a las formas especiales, un trinomio en latín, con el nombre de la especie seguido de una referencia al huésped al que parasitan ha llevado a muchos investigadores a pensar que representan un grupo monofilético natural. Datos recientes demuestran que dentro de algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum* (*F.oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* y *F. oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*) existen aislamientos de orígenes independientes (Kistler, 2001). Por lo tanto la asociación de determinadas cepas con un hospedador no implica necesariamente una divergencia de carácter monofilético.

Dentro de *F. oxysporum* han sido descritas más de 70 formas especiales (Armstrong y Armstrong, 1981) cada una de las cuales, la mayoría de las veces, presentan un rango de hospedadores restringido a unas pocas especies de un mismo género. Pero algunas de las formas especiales como *F. oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* pueden causar enfermedades en otras familias de plantas además de en las plantas de tomate (Menzies, *et al.*, 1990).

Las variaciones en la virulencia de distintas cepas dentro de cada forma especial ha sido definida mediante el concepto de razas patogénicas. Las distintas razas interactúan de forma diferencial con los genotipos del huésped, estando esta interacción determinada por uno o mas genes de resistencia presentes en los distintos cultivares (Gordon y Martyn, 1997). La teoría de Flor (Flor, 1956) gen por gen, propone la presencia del mismo número de genes de virulencia en el hongo que de resistencia en el hospedador cuya interacción determinaría la resistencia de determinados cultivares a determinadas razas. Esta definición de raza como la correlación entre un aislamiento del hongo y el genotipo específico de un determinado cultivar no siempre es válida y existen ejemplos de razas que se refieren a aislamientos que, dentro de una misma forma especial, atacan a diferentes especies de plantas (Kistler, 1997). A pesar de las excepciones el uso general del término es la de especificidad a nivel de cultivar. Se sabe poco acerca de cómo se originan las distintas razas de *F. oxysporum* en nuevas localizaciones, pudiendo tener un origen independiente o por el contrario haber sido transportadas gracias al comercio y a la agricultura global (Gordon y Okamoto, 1992).

El último concepto hace referencia a la variabilidad genética que existe entre los distintos aislamientos de una misma especie. Los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) son un test objetivo para determinar la similitud genética entre dos aislamientos, ya que, en algunos ascomicetos se ha caracterizado bien el sistema y se ha comprobado que este tipo de compatibilidad es el resultado de la interacción de alelos distintos situados en diversos *loci* (Kistler, 1997).

Estudios con marcadores moleculares han demostrado que los aislamientos pertenecientes a un mismo VCG suelen ser más similares que aislamientos pertenecientes a distintos grupos (Leslie, 1993). A pesar de que existen excepciones a esta regla se suele asumir que las cepas dentro de un mismo VCG se relacionan genéticamente aunque no exista una correlación entre VCG, formas especiales y razas. Generalmente las formas especiales agrupan aislamientos que pueden ser incluidos en distintos VCGs y lo mismo ocurre con las distintas razas de una misma forma especial, como ocurre con los aislamientos de la raza 1 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Mes, et al., 1999a).

De entre todas las formas especiales de *F. oxysporum* existen dos de gran importancia cuyos aislamientos son patógenos de las especies del género *Lycopersicon* y que causan grandes pérdidas económicas. A continuación pasaremos a detallar las distintas patologías que provocan estas dos formas especiales en el tomate.

Las fusariosis del tomate.

F. oxysporum f.sp. *lycopersici* (FOL) produce marchitamiento vascular en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). En 1895 fue descrita por Masee (Masee, 1895) y ha sido descrita en al menos 32 países. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate, siendo una de las más destructivas. Este patógeno entra por las raíces tanto por penetración activa como por aberturas naturales como las que se forman en el córtex por la formación de raíces laterales (Mes, et al., 2000b). En los vasos xilemáticos el hongo se extiende, las esporas germinan y, si la planta es susceptible coloniza el parénquima xilemático secundario.

En 1940 se descubrió un cultivar resistente a la enfermedad y se observó que dicho cultivar presentaba un gen *I*, que confería resistencia a la raza 1 del FOL. Posteriormente apareció una segunda raza (raza 2) que provoca la enfermedad en cultivares resistentes a la raza 1. Esta raza fue

también controlada por el descubrimiento y posterior incorporación, de un nuevo gen dominante para la resistencia, el gen *I-2*. En 1981 se identificó una nueva raza en Brasil, a la que se denominó raza 3. Se asume que la interacción entre FOL y el tomate sigue la teoría de Flor, gen por gen (Flor, 1956), dado que han sido descritas resistencias monogénicas dominantes para las tres razas.

Recientemente, ha sido caracterizado molecularmente el gen *I-2* y se ha visto que pertenece a una familia de genes denominada I2C (Ori, *et al.*, 1997). Otros estudios revelan que alguno de los miembros de esta familia situados en el mismo *locus* que *I-2* no son genes de resistencia funcionales (Simons, *et al.*, 1998). Estos genes comparten características con otros genes de resistencia caracterizados hasta la fecha, ya que, pertenecen todos a una familia de proteínas con motivos de unión a secuencias de DNA y con motivos ricos en leucina (Mes, *et al.*, 1999b). Sin embargo, no se han identificado elementos comunes en los genes de virulencia presentes en el patógeno, lo que ha dificultado su caracterización. Hasta ahora sólo existe una evidencia indirecta de la presencia de estos genes en FOL y de que exista una interacción gen a gen entre este patógeno y la planta de tomate (Mes, *et al.*, 1999a). Recientemente, se ha observado mediante la utilización de un gen informador, la expresión del gen de resistencia *I-2* en tejidos vasculares de los frutos, hojas y raíces. Así como en los tejidos que rodean a los vasos xilemáticos, esto sugiere una correlación entre la actuación de este gen y el bloqueo del crecimiento del patógeno en el sistema vascular de las plantas resistentes a la raza 2 (Mes, *et al.*, 2000b).

Este parásito, al igual que los demás hongos, que producen vasculariosis tiene la capacidad de establecerse en el sistema de vasos de su huésped. Después de que el parásito haya invadido los vasos xilemáticos del huésped comienzan a aparecer la mayoría de síntomas en la hojas como marchitamiento, clorosis, necrosis, abscisiones. Se produce además, de los síntomas externos, un taponamiento de los elementos traqueales, debido por un lado al crecimiento del hongo y, por otro, al gel que se origina como

consecuencia de la mezcla de productos pécticos liberados por la actividad enzimática. El hongo produce, además, toxinas extracelulares que se desplazan hacia las hojas provocando la pérdida de turgencia. Todos estos efectos combinados son posiblemente los responsables del marchitamiento de los cultivos (Roberts y Boothroyd, 1984).

La otra forma especial patógena del género *Lycopersicon*, es *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) (Jarvis y Shoemaker, 1978) (Figura 1.3). La podredumbre de la raíz provocada por las cepas de FORL es la segunda enfermedad más importante del tomate producida por *Fusarium*. Fue documentada inicialmente en Japón pero se ha extendido por Canadá, Estados Unidos (Jones y Woltz, 1981), Israel (Krikun, *et al.*, 1982), Francia (Couteaudier, 1984) y Grecia (Malathrakis, 1985).



Figura 1.3: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) aislamiento raíz cultivado durante siete días en medio PDA.

En otoño de 1985, se demostró que el agente causal de la enfermedad de los cultivos de tomate de invernadero de la región de Murcia era FORL, basándose en la sintomatología y en los tests de patogenicidad (Tello y Lacasa,

1988). Su difusión es especialmente grave en los invernaderos donde los cultivos suelen ser continuos, además de carecer de microflora que compita con el patógeno (Beckman, 1987). Aunque el tomate (*Lycopersicon esculentum*) es su hospedador principal, puede afectar al pimiento (*Capsicum frutescens*) (Yamamoto, *et al.*, 1974) y a la berenjena (*Solanum melongena*) (Rowe, 1980). También se ha descrito que muchas leguminosas pueden ser susceptibles (Jones, *et al.*, 1991).



Figura 1.4: Síntomas producidos por FORL a los 21 (a) y 28 (b) días. A la izquierda raíces inoculadas y a la derecha plantas control (Patiño, *et al.*, 1999).

Los síntomas que produce en la planta son distintos a los producidos por los aislamientos de FOL (Figura 1.4). Un signo característico de la enfermedad es la podredumbre que se observa en el sistema radicular, que en el caso más grave afecta en su totalidad a las raíces principal y secundaria. En ocasiones, la médula presenta una podredumbre húmeda de color marrón intenso, que se extiende sobre la zona de transición raíz-cuello. En el tallo también puede aparecer una necrosis que puede llegar hasta la copa (Tello, 1988). Estos síntomas se consideran intermedios entre las podredumbres de la corteza y las vasculariosis producidas por otras cepas de *Fusarium*. El hongo es capaz de infectar a las semillas (Jarvis y Thorpe, 1976), pero la planta infectada experimentalmente, no se marchita normalmente hasta que se producen las condiciones adecuadas para el nacimiento del fruto (Yamamoto, *et al.*, 1974). Produce una desintegración extensiva de la pared celular, provocando alteraciones similares a las producidas por otros patógenos vasculares y a pesar

de que la podredumbre de la raíz y cuello de la planta es el síntoma principal se puede producir también marchitamiento de la planta (Charest, *et al.*, 1983).

Estudios recientes demuestran que el contacto entre las hifas y la raíz de la planta se establece mayoritariamente en los pelos radiculares (Lagopodi, *et al.*, 2002). Se ha observado que 4 días después de inocular el hongo en la tierra donde se encuentra la planta, se producen las primeras infecciones por penetración directa, preferentemente por las uniones de las células de la epidermis y no por las puntas de las raíces o los sitios de emergencia de raíces secundarias. Además, no se ha observado ninguna estructura de penetración específica como el apresorio. La colonización de la epidermis y el córtex ocurre intra e intercelularmente (Lagopodi, *et al.*, 2002), hecho que lo diferencia de otras especies de *Fusarium*. Estudios histológicos demuestran que la muerte de las células de la raíz de la planta del tomate se produce rápidamente (Brammall y Higgins, 1988). Cinco días después de la infección las plantas ya tienen manchas oscuras en la raíz y las células de la epidermis ya han sido colonizadas completamente por las hifas. Diez días después de la inoculación se ha producido senescencia en la planta y el hongo ha esporulado formando macroconidios (Lagopodi, *et al.*, 2002).

FORL es capaz de crecer en las paredes celulares del huésped produciendo su desorganización. Las hifas pueden producir la degradación de las paredes celulares a distancias de 15-30 μm lo que indica una producción de enzimas que degradan la lámina media y las paredes celulares primaria y secundaria (Charest, *et al.*, 1983). Debido a su importancia como patógeno y al tipo de síntomas que provoca en su huésped *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* podría ser un buen modelo para estudiar cual es el papel de las enzimas producidas por el hongo el proceso de patogénesis y en la interacción huésped patógeno.

La pectina.

Los microorganismos patógenos presentan diversos mecanismos que les van a permitir completar con éxito la patogénesis. Se entiende por patogénesis el proceso que va desde el momento en el que se produce el contacto entre el patógeno y su huésped hasta que se desarrolla la enfermedad en la planta (MacHardy y Beckman, 1981). El primer paso para que este proceso tenga éxito es la colonización de la planta por parte del parásito y para ello los patógenos han de conseguir atravesar la pared celular vegetal que es la primera barrera de defensa que tiene la planta.

La pared celular vegetal es una matriz compleja que define las características individuales de las células dentro de la planta. La importancia de esta estructura se pone de manifiesto con recientes datos que indican que el 15% de todos los genes de *Arabidopsis* están dedicados a la construcción de la pared celular (Carpita, *et al.*, 2001). Además esta estructura no sólo define la morfología de toda la planta sino que juega un papel fundamental en la comunicación entre células y en las señales que van de la pared al interior de la célula. La pared celular de la planta es una estructura altamente organizada que puede contener diferentes carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y polisacáridos pécticos) así como, proteínas, lignina y sustancias incrustadas como cutina, suberina y compuestos inorgánicos. Esta estructura compleja se presenta en las células vegetales de dos maneras, por lo que tradicionalmente se ha dividido en dos tipos una pared celular primaria fina y una secundaria más gruesa (Albersheim, 1965).

La pared primaria se encuentra en células jóvenes e indiferenciadas que están en crecimiento, y su estructura es similar en gran variedad de plantas superiores (Vidhyasekaran, 1997) y su composición es compleja tanto en lo que se refiere a sus componentes como en su organización (Figura I.5). Está formada principalmente por polisacáridos pécticos, fibras de celulosa hemicelulosas que unen las fibras de celulosa con las moléculas de pectina de la pared. Contiene también, proteínas estructurales. ricas en hidroxiprolina, prolina y glicina (Vidhyasekaran, 1997).

La pared secundaria, sin embargo, se encuentra en células diferenciadas que han dejado de crecer. Tanto su composición como su estructura varían considerablemente entre un tipo celular y otro (Talmadge, *et al.*, 1973), siendo sus componentes principales lignina, suberina y componentes inorgánicos (Vidhyasekaran, 1997).

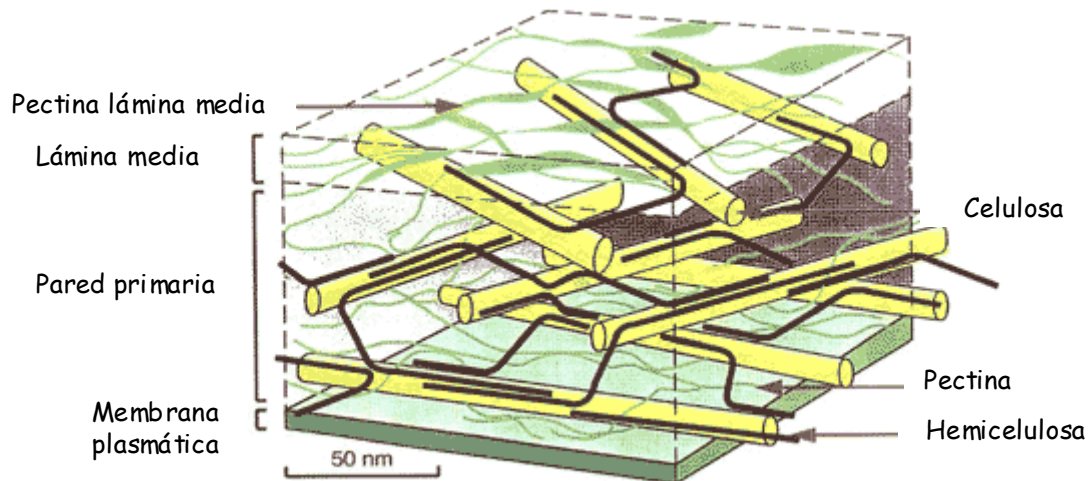


Figura I.5: Esquema de la pared celular vegetal (http://www.ipppa.info/what_is_pectin.htm).

El componente principal de la pared primaria de las plantas superiores es la pectina. Esta molécula está presente también en la lámina media, estructura que se sitúa entre las paredes celulares primarias, donde juega un papel fundamental en la adhesión entre distintas células. Aunque se encuentra generalmente en bajo porcentaje dentro de la planta, entre un 0,5% y un 4% del peso fresco de la planta, se considera sin embargo un componente de gran importancia debido a que dota de rigidez a las paredes celulares y mantiene la integridad y coherencia del tejido vegetal (Kashyap, *et al.*, 2001). Además la matriz de pectina confiere un entorno adecuado para que las fibras de celulosa se extiendan (Willats, *et al.*, 2001), y desempeña un papel activo frente a patógenos o simbiontes generando moléculas que actúan de señales inductoras de los mecanismos de defensa en la planta (Ryan, 1990).

La composición de la pectina es compleja (Figura I.6) habiéndose aislado tres tipos distintos de polisacáridos de pectina de las paredes celulares vegetales. El homogalacturónico (HGA) consta de un eje central de moléculas de ácido galacturónico unidas entre sí por enlaces $\alpha(1-4)$ glicosídicos. Puede tener modificados los residuos de galacturónico con metilaciones, acetilaciones y uniones de residuos de xilosa (Willats, *et al.*, 2001). El rhamnogalacturónico I (RG-I) está formado por cadenas complejas y abundantes de repeticiones del disacárido (1-2)- α -L-Ramnososa-(1-4)- α -D-galacturónico que se unen glicosídicamente a los residuos de HGA (Ridley, *et al.*, 2001). Por último, los rhamnogalacturónicos –II (RG-II) son también cadenas del disacárido (1-2)- α -L-Ramnososa-(1-4)- α -D-galacturónico pero con cadenas laterales que contienen 11 tipos de azúcares distintos y se unen covalentemente a los residuos de HGA. Estos últimos han despertado gran interés para la salud y nutrición humanas debido a que se ha demostrado que es muy abundante en el vino y zumos, que se une a metales pesados y que tiene actividades inmunomoduladoras (Ridley, *et al.*, 2001).

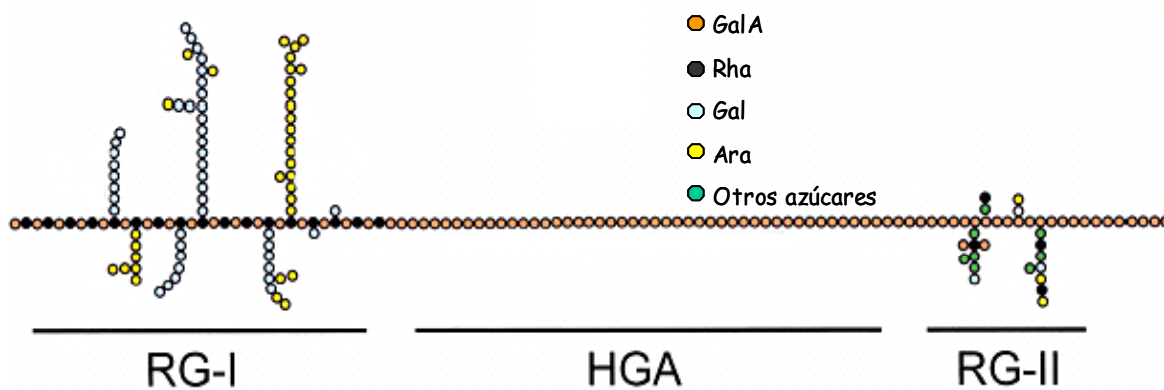


Figura I.6 : Hipotética estructura de los dominios de la molécula de pectina RG-I, HGA y RG-II (Willats, *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios para determinar la conformación de estos polímeros dentro de la pared celular. El dominio mejor estudiado ha sido el HGA, y se ha observado que su conformación presenta una gran flexibilidad. Las cadenas de HGAs se asocian con iones calcio formando una estructura que ha sido descrita con el modelo de “cajas de huevo” (Carpita y Gibeaut,

1993). Esta interacción de las cadenas de HGA con los iones calcio hace que se formen geles que son muy importantes para el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares y de la red que forma la pectina (Willats, *et al.*, 2001). Los dominios RG-I parece que podrían adoptar distintas estructuras helicoidales dentro de la molécula de pectina, ya que, sus componentes son altamente móviles dentro de las paredes celulares y podrían ajustarse, incluso las más largas, fácilmente al esqueleto principal. (Willats, *et al.*, 2001) Por último, no se ha propuesto un modelo tridimensional para el dominio RG II ya que la complejidad de este polisacárido hace que sea difícil determinar sus parámetros conformacionales aunque se ha observado que forma dímeros mediante interacciones con el borato.

Como hemos visto, las sustancias pécticas son moléculas de gran complejidad y presentan numerosas modificaciones por lo que se han utilizado diferentes términos para designarlas. En 1944 el Comité para la Revisión de la Nomenclatura de las sustancias pécticas aceptó las siguientes definiciones (Sakai, *et al.*, 1993). Los ácidos pécticos son las cadenas de ácidos poligalacturónicos que están esencialmente libres de grupos metiléster. Por pectina se entiende generalmente las cadenas de poligalacturónicos metilesterificadas y que son capaces por sí solos de formar geles con azúcares, ácidos y otros compuestos como las sales de calcio. La protopectina es la molécula tal como se encuentra en las paredes celulares vegetales, interaccionando con otros polisacáridos estructurales y proteínas (Kashyap, *et al.*, 2001).

La gran complejidad estructural y conformacional que presentan estas sustancias y su naturaleza dinámica probablemente confieran a la pared celular diversas propiedades. Esta naturaleza se ha ido desvelando con el desarrollo de las herramientas adecuadas, pero, aunque estudios recientes sitúan algunas de las características estructurales de la pectina en su contexto biológico, todavía queda por resolver la función de los microdominios dentro de la pared celular (Willats, *et al.*, 2001).

Enzimas pécticas

Las enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE) son proteínas producidas por hongos patogénicos y saprofitos que invaden o utilizan como nutrientes los tejidos de la planta. La degradación de la pared celular es un hecho esencial para los hongos patógenos, dado que al romper la primera barrera defensiva de la planta, les va a permitir la penetración y extensión dentro de los tejidos vegetales. Además, gracias a esta degradación se liberaran nutrientes necesarios para el crecimiento del patógeno. La mayoría de los hongos producen una amplia variedad de enzimas degradadoras de pared celular que refleja el grado de complejidad que tiene la estructura de la pared. Han sido identificadas diferentes actividades, enzimas pécticas, celulasas, arabinasas, xilanasas y galactanasas (De Lorenzo, 1997).

Dado que la pectina es el mayor componente de la pared celular, el grupo de enzimas degradadoras de pared celular tradicionalmente más estudiado han sido las enzimas pécticas o pectinasas. Estas proteínas se encargan de degradar las sustancias pécticas presentes en la lamina media y en la pared celular primaria de las plantas superiores.

Debido a la complejidad de las sustancias pécticas, la diversidad de las pectinasas es alta y se han dividido en tres grupos (Kashyap, *et al.*, 2001):

Pectinesterasas (PE) catalizan la desesterificación de la pectina transformándola en ácidos pécticos.

Protopectinasa: esta enzima solubiliza la protopectina formando moléculas de pectina solubles.

Por último, las pectinasas despolimerizantes que son el grupo mas amplio y su clasificación se basa en varios criterios. El principal criterio de clasificación es el mecanismo de lisis de la molécula, ya que las pectinasas pueden actuar por trans-eliminación (liasas) o bien por hidrólisis (hidrolasas). El segundo es el tipo de sustrato que van a utilizar, es decir, si degradan la pectina o el ácido péctico. El último criterio es el modo de acción de las enzimas, ya que, pueden romper las sustancias pécticas al azar (endo)

liberando oligómeros, o bien, por su extremo no reductor (exo) liberando monómeros, dímeros.

Según estos criterios podremos encontrar dos grupos de pectinasas despolimerizantes en función del mecanismo de lisis. Pueden ser hidrolasas como las polimetilgalacturonasas (PMGs) que rompen los enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ de moléculas de pectina altamente esterificados y las poligalacturonasas (PGs) que rompen los enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ de la molécula de ácido péctico. También pueden romper los enlaces por trans-eliminación dejando un galacturónico con un enlace insaturado al final de la cadena, en cuyo caso pueden ser polimetilgalacturónico liasas (PMGL) si actúan sobre las moléculas de pectina o poligalacturónico liasas (PGL) si lo hacen sobre ácidos pécticos. Además, todas estas enzimas pueden tener un modo de acción “exo” o bien actuar de forma “endo”.

Como hemos visto la pectinólisis es un fenómeno importante para los microorganismos patógenos, pero la degradación de las sustancias pécticas también está asociada a otros procesos biológicos propios de la planta como el crecimiento, la maduración de los frutos y la abscisión de las hojas (Rombouts y Pilnik, 1980). Recientemente se han caracterizado seis diferentes genes codificadores de poligalacturonasas en el tomate agrupados en dos *clusters* situados en dos cromosomas diferentes (Hong y Tucker, 1998). Estudios anteriores demostraron que genes de poligalacturonasas se expresan durante la abscisión de hojas y flores en el tomate (Kalaitzis, *et al.*, 1997) así como la existencia de actividad pectato liasa en la maduración de la banana (Payasi y Sanwal, 2003).

Además de su importancia en las interacciones entre plantas y patógenos y en procesos biológicos de las plantas, las enzimas pécticas han sido utilizadas por el hombre con diferentes fines industriales. Su primera aplicación comercial data de 1930 para preparar vinos y zumos de fruta. Actualmente preparados enzimáticos de pectinasas se utilizan en los procesos de extracción, clarificación y liquefacción de zumos, para mejorar la calidad del

producto, así como en la industria textil, y en otras aplicaciones biotecnológicas como la producción de papel, la extracción de aceite y la fermentación de te y café. El valor estimado de ventas de enzimas pécticas en 1995 fue de 75 millones de dólares siendo el mercado de las enzimas industriales de 1 billón de dólares (Kashyap, *et al.*, 2001).

La importancia de las enzimas pécticas en la patogénesis y su papel en los procesos de colonización de la planta ha llevado al desarrollo de numerosos estudios. Se ha observado en cultivos *in vitro* con restos de paredes vegetales que las primeras enzimas degradadoras de pared celular producidas por los hongos son las enzimas pécticas, seguidas de las hemicelulasas y celulasas (De Lorenzo, 1997). La acción de estas enzimas, en especial de las poligalacturonasas, parece ser un requisito indispensable para que actúen las demás enzimas degradadoras de pared celular. La aparición secuencial de las CWDE podría tener su explicación en el hecho de que sólo después de que hayan actuado las enzimas pécticas, la red de celulosa antes rodeada por la pectina pasaría a ser accesible y los inductores de celulasas y hemicelulasas serían liberados (De Lorenzo, 1997). Por ello, la mayoría de los estudios sobre enzimas degradadoras de pared celular se han centrado en las enzimas pécticas y en especial en las poligalacturonasas.

Poligalacturonasas.

Las poligalacturonasas (PGs; EC 3.2.1.15) han sido clasificadas dentro de la familia 28 de hidrolasas glicosídicas degradadoras de pectina. Este sistema de clasificación de los dominios catalíticos en familias, en base a la similitud entre aminoácidos fue introducido por Henrissat (1991). Con el paso del tiempo el número de familias ha ido creciendo y actualmente se pueden ver las actualizaciones del sistema en el siguiente sitio <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html> (Henrissat y Davies, 2000).

Existen más de 115 secuencias de poligalacturonasas dentro de la base de datos de GenBank (Benson, *et al.*, 2002) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La

mayor parte de ellas pertenecen a hongos, bacterias y plantas, aunque también han sido descritas en insectos (GenBank Y17906) e incluso en *Caenorhabditis elegans* (GenBank NP508878). La mayoría de las PGs descritas en hongos son endopoligalacturonasas (ENDOPGs), habiendo sido caracterizados únicamente 5 genes codificadores de exopoligalacturonasas (EXOPGs) en hongos filamentosos: una en *Fusarium oxysporum* (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000), *Aspergillus tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996), *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998), *Aspergillus nidulans* (GenBank. AY237304) y *Botryotinia fuckeliana* (GenBank AF145229). Se ha descrito la presencia de EXOPGs en otras especies de hongos como *Penicillium frequentans* (Dos, *et al.*, 2002), *Botrytis cinerea* (Rha, *et al.*, 2001) y *A. niger* (Sakamoto, *et al.*, 2002).

En los últimos años se han realizado análisis filogenéticos utilizando las secuencias de aminoácidos de las PGs presentes en el GenBank. Wubben *et al.* (1999) analizaron 35 ENDOPGs descritas en hongos filamentosos y propusieron la existencia de 5 grupos de orígenes monofiléticos. Dentro de cada grupo había PGs descritas en distintas especies de hongos, lo que indicaba que todas las PGs de un mismo grupo derivaban de un gen ancestral que existiría antes de la divergencia de las especies de hongos.

Recientemente este análisis ha sido ampliado por Markovic y Janecek (2001) incorporando las secuencias de aminoácidos de todas las PGs presentes en el GenBank de orígenes fúngicos, bacterianos y vegetales, y de las demás enzimas que pertenecen a la familia 28 de hidrolasas glicosídicas degradadoras de pectina. Básicamente el análisis filogenético divide a las PGs en tres grandes grupos en función de su origen, y en el caso de las PGs bacterianas y fúngicas en función de su modo de acción. Las EXOPGs fúngicas forman un grupo homogéneo y claramente aislado de las ENDOPGs de hongos, lo que ha llevado a algunos autores a proponer que las EXOPGs están más cerca filogenéticamente de las PGs de plantas que de las ENDOPGs de hongos (Kester, *et al.*, 1996). Esta separación puede tener cierta importancia

biológica y reflejar el distinto papel que desempeñan estas enzimas en la interacción entre el huésped y el patógeno.

También se han realizado trabajos comparativos de las PGs fúngicas que han permitido determinar cuales son los dominios de su estructura primaria que están altamente conservados. Caprari, *et al.* (1993b), Kitamoto, *et al.* (1993), y Reymond, *et al.* (1994) propusieron los motivos ²²²Gly-His-Gly, ²⁵⁶Arg-Ile-Lys, ¹⁷⁸Asn-X-Asp y ²⁰¹Asp-Asp y los residuos ²²⁸Gly y ³⁵⁵Tyr fueron propuestos por Stratilova, *et al.* (1998) (la numeración de los motivos corresponde a la posición que ocupan en la secuencia de *A. niger* PG2). La presencia de estos motivos en casi todas las PGs fúngicas hizo pensar en su posible implicación tanto en la actividad como en la unión al sustrato de estas enzimas. Caprari, *et al.* (1996) mediante un estudio de mutagénesis dirigida, comprobaron que el residuo ²³⁴His (correspondiente a la ²²³His de *A. niger* PG2) de la ENDOPG de *F. moniliforme* era necesario para la actividad de la enzima, confirmando así el significado funcional de uno de estos motivos conservados. Un trabajo reciente ha confirmado que los residuos ¹⁷⁸Asp, ²⁰¹Asp, ²⁰²Asp están implicados en la actividad catalítica y los residuos ²⁵⁶Arg y ²⁵⁸Lys en la unión al sustrato (van Santen, *et al.*, 1999).

Los primeros estudios de poligalacturonasas se realizaron en cultivos *in vitro* y el uso de técnicas como el isoelectroenfoque (IEF) permitió poner de manifiesto la presencia de una gran cantidad de isoformas en los cultivos, y que el patrón de expresión de estas enzimas varía en función de diferentes condiciones, dependiendo del aislamiento, así como, de las condiciones del cultivo (Guevara, *et al.*, 1997; Caprari, *et al.*, 1993a; Stratilova, *et al.*, 1998). Estas formas pueden diferir tanto en su estabilidad, actividad, pH óptimo o la preferencia de sustrato y el tipo de oligosacáridos liberados. Asimismo, se ha sugerido que estas diferentes formas de una misma enzima podría estar relacionadas con el rango de hospedadores que puede infectar el patógeno (De Lorenzo, 1997).

A pesar de la aparición de trabajos presentando nuevos genes de PGs, todavía existe poca información sobre las bases genéticas del polimorfismo observado en los cultivos. Se han descrito familias de genes de PGs en algunos hongos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet, *et al.*, 1995), *Aspergillus niger* (Bussink, *et al.*, 1992) y *Botrytis cinerea* (Wubben, *et al.*, 1999). También se ha publicado recientemente la existencia de una familia de genes codificadora de PGs en el basidiomiceto *Chondrostereum purpureum* (Williams, *et al.*, 2002).

Sin embargo, en otras especies de hongos sólo han sido descritos uno o varios genes codificadores de PGs que están presentes en una única copia dentro del genoma, es decir que no forman parte de la misma familia. Tal es el caso de la ENDOPG (Scott-Craig, *et al.*, 1990) y EXOPG (Scott-Craig, *et al.*, 1998) descritas en *Cochliobolus carbonum*, la EXOPG de *A. tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996) o las dos ENDOPGs de *Colletotrichum lindemuthianum* (Centis, *et al.*, 1997). Dentro del género *Fusarium* han sido caracterizados dos genes diferentes de ENDOPG (Arie, *et al.*, 1998; Garcia-Maceira, *et al.*, 2001), y una EXOPG (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000) en *F. oxysporum*, uno de ENDOPG en *F. circinatum* (Chimwamurombe, *et al.*, 2001) y otro en *F. moniliforme* (Caprari, *et al.*, 1993b).

Esta variabilidad en las bases genéticas de estas enzimas nos hizo plantearnos cual sería el caso de *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, ya que, en el momento de comenzar el trabajo sólo habían sido descritos en FORL la secuencia parcial de dos genes de PGs uno codificador de ENDOPG (Patiño, *et al.*, 1997a) y otro de EXOPG (Posada, 1999).

Esta heterogenicidad en número y organización de los genes de PGs no basta para explicar en todos los casos, la variedad de isoformas encontradas. Se ha observado que existen modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación que contribuyen a producir nuevas isoformas. Tal es el caso de la ENDOPG de *F. moniliforme*, en donde se ha comprobado que a partir de un único gen se pueden producir cuatro formas distintas con diferentes masas

moleculares mediante glicosilación diferencial (Caprari, *et al.*, 1993a). Asimismo, en *Penicillium olsonii* cuando se interrumpe el gen *pg1* desaparecen todas las isoformas de carácter básico presentes en los cultivos y mutantes para el gen *pg2* pierden la mayoría de isoformas ácidas (Wagner, *et al.*, 2000). Al igual que ocurre con la ENDOPG de *F. moniliforme* la glicosilación juega un papel fundamental en la formación de diferentes isoformas y por otro lado, la glicosilación podría ser esencial para la actividad de la enzima, como se ha observado en *A. niger* en donde la ENDOPG descrita pierde la actividad cuando se desglicosila. (Stratilova, *et al.*, 1998)

La presencia de numerosos genes que codifican para distintas PGs junto con la existencia de mecanismos de modificación post traduccional, como la glicosilación, contribuirían a explicar la diversidad de isoformas que presentan estas enzimas. La redundancia en función de estas enzimas implicadas en el proceso de colonización podría conferir al patógeno una mayor flexibilidad a la hora de adaptarse a nuevas condiciones u hospedadores, por ello, la determinación de cómo se regulan estos genes sería un paso importante para entender cuál es el significado biológico de esta variabilidad.

Numerosos estudios indican que los genes de PGs están regulados a nivel transcripcional. (Lang y Dornenburg, 2000). Se ha observado en diversas especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y en *C. carbonum* que en cultivos *in vitro* los genes de PGs en general son inducidos mediante sustrato y reprimidos por glucosa (Annis y Goodwin, 1997). Aún así, el carácter inducible de estos genes no siempre es cierto, ya que también se han descrito casos en los que los genes de PG se expresan de forma constitutiva (Wubben, *et al.*, 1999). La expresión constitutiva de genes de PGs se ha observado también en *A. niger* en donde, la expresión de los genes *pgaA* y *pgaB* ha sido detectada en cultivos *in vitro* con numerosas fuentes de carbono (Parenicova, *et al.*, 2000). Existen también ejemplos de algunos genes de PGs en los que no existe la represión catabólica y en medios con glucosa se detecta una inducción, como el gen *bcp3* de *B. cinerea* (Wubben, *et al.*, 1999) y el *pg1* de *Penicillium olsonii* (Wagner, *et al.*, 2000). Por otro lado, la presencia de más de un gen con la

misma función en muchos de los casos descritos también plantea el interrogante de si la regulación de estos genes es coordinada o por el contrario presentan una regulación diferencial. En *B. cinerea* se ha observado que no todos los genes de la misma familia de PGs tienen la misma regulación en cultivos *in vitro* (Wubben, *et al.*, 1999).

Este mecanismo general en la regulación por sustrato de las PGs se ha visto ampliado por numerosos estudios recientes que indican una mayor complejidad en la regulación de estos genes. Se ha observado que existen otros factores, como el pH, que están implicados en la regulación transcripcional de estos genes. En *B. cinerea* un medio de pH ácido produce un efecto represor sobre la expresión del gen *bcp_g2* e inductor sobre el gen *bcp_g3* (Wubben, *et al.*, 2000), asimismo se ha observado la influencia del pH en la regulación de otros genes codificadores de PGs como el gen *pg1* de *F. oxysporum* (Di Pietro y Roncero, 1998).

Otro hecho a destacar es que los patrones de expresión *in vivo* de las PGs en parte no son idénticos a los observados *in vitro*. Este hecho ha sido documentado en un estudio comparativo de los patrones de expresión de la familia de genes de PGs de *B. cinerea*, en donde se ha observado que existen diferencias entre la expresión de algunos de los genes en los cultivos *in vitro* (Wubben, *et al.*, 1999) con los obtenidos en planta infectada (ten Have, *et al.*, 2001). Estos trabajos reflejan cómo influye en la regulación de las PGs otros factores como el tipo de tejido del huésped, el estado de la infección y la temperatura. A pesar de las diferencias Wubben postuló, basándose en estudios realizados en cultivos *in vitro*, cuatro mecanismos de regulación que podrían contribuir a entender la expresión de estos genes en planta infectada. Estos serían, expresión basal, inducción por monómeros de pectina, represión mediante glucosa y modulación de la expresión mediante el pH del medio (Wubben, *et al.*, 2000).

En los últimos años se han publicado diversos trabajos que centran el interés en otro aspecto de las PGs que podría ser esencial para entender mejor

su significado biológico, su estructura terciaria (Figura I.7). La primera estructura descrita en 1993 correspondía a una pectato liasa de *Erwinia chrysanthemi* (Yoder, *et al.*, 1993) y a partir de ese momento se ha producido la aparición de numerosos estudios en los que se presentaban las estructuras de diversas enzimas pécticas. La mayoría de las estructuras descritas son de pectin y pectato liasas, y recientemente se han publicado la estructura de las ENDOPGs de *E. carotovora* (Pickersgill, *et al.*, 1998), *A. niger* (van Santen, *et al.*, 1999), *A. aculeatus* (Cho, *et al.*, 2001) y *F. moniliforme* (Federici, *et al.*, 2001), no habiendo sido descrita hasta la fecha la estructura de ninguna EXOPG. Todas ellas presentan una estructura muy conservada (Cho, *et al.*, 2001) que ha sido denominada β hélice paralela dextrógira (Yoder, *et al.*, 1993), la cual contiene puentes disulfuro que contribuyen a su estabilización, y que se forman entre residuos de cisteína conservados en la mayoría de las PGs fúngicas. Además en las EXOPGs existen dos residuos de cisteína no presentes en las ENDOPGs que posiblemente estarán implicados en la formación de puentes disulfuro adicionales (Markovic y Janecek, 2001). Estos estudios, así como, la determinación de sus propiedades físico-químicas dependen de la disponibilidad de enzima suficiente, limitación importante que se manifiesta en los pocos casos de enzimas purificadas.

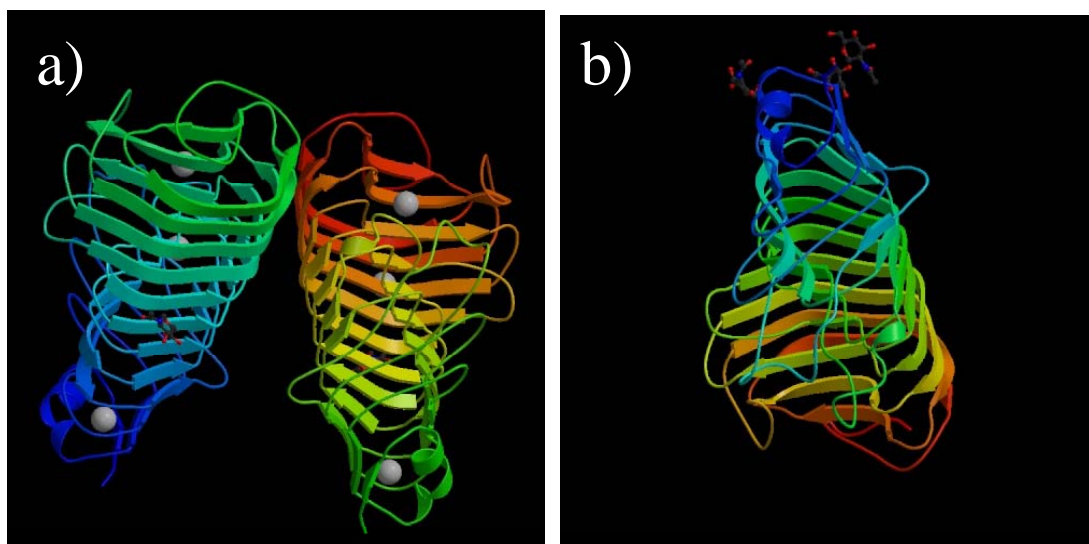


Figura I.7: Estructura tridimensional de las poligalacturonasas de a) *A. niger* (van Santen, *et al.*, 1999) y b) *F. moniliforme* (Federici, *et al.*, 2001).

El interés despertado por estas enzimas es en parte, debido a la importancia que tienen en los procesos de interacción entre huésped y patógeno y a su posible implicación en la patogénesis. Esta interacción es posible gracias a una serie de señales complejas (Esquerre-Tugaye, *et al.*, 2000) en donde también juegan un papel importante las PGs. Los oligogalacturónicos liberados por la acción de las PGs por la hidrólisis de la pectina son de una gran importancia en el diálogo molecular que se establece durante el proceso de patogénesis. Además de ser utilizados como nutrientes por el hongo permitiendo su crecimiento y posterior expansión, se ha comprobado que también juegan un papel fundamental como inductores tanto de otras enzimas pécticas del hongo, como de los sistemas de defensa de las plantas.

Diferentes estudios demuestran que las ENDOPGs fúngicas inducen la acumulación de fitoalexinas y de proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs), así como la síntesis de ligninas y la producción de glucanasas, quitinasas, todos ellos mecanismos que utiliza la planta para evitar la colonización por parte del patógeno (De Lorenzo, 1997). Todas estas respuestas son inducidas por oligogalacturónicos cuya longitud varía entre 10 y 15 moléculas de galacturónico, por lo que una actuación de las EXOPGs provocaría la degradación de estos oligogalacturónicos a oligómeros inactivos. Las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs) producidas por la planta son las encargadas de modular la actuación de las ENDOPGs mediante la formación de un complejo específico, reversible y de gran afinidad, que evita la degradación de la pectina, así como, el crecimiento del hongo. Son proteínas localizadas en la pared celular de la planta que se inducen durante el proceso de infección y que presentan una gran variabilidad en sus capacidades de reconocimiento e inhibición de las ENDOPGs fúngicas (De Lorenzo y Ferrari, 2002).

No se ha descrito que las PGIPs interactúen con las EXOPGs por lo que, estas enzimas podrían ser de gran utilidad para el hongo a la hora de evitar la inducción de las respuestas de defensa de la planta degradando los

oligogalacturónicos activos en monómeros y dímeros, y proporcionando además nutrientes al hongo. Por otro lado, estos monómeros son capaces de inducir otros genes de pectinasas desencadenando todo el arsenal de enzimas degradadoras de la pared celular.

Debido a la importancia de las PGs como las primeras enzimas en actuar para romper la pectina de pared celular vegetal, y en los procesos de comunicación molecular entre el huésped y el patógeno se han realizado numerosos estudios para determinar cual es el papel real que juegan estas enzimas en los procesos de virulencia y patogenicidad, pero todavía existe controversia sobre el tema, ya que, en la bibliografía se observan ejemplos que apoyan tesis contradictorias. Así, por ejemplo, y mediante el desarrollo de técnicas de producción de mutaciones dirigidas, han aparecido trabajos en donde al inactivar genes concretos de PGs encontramos que no juegan un papel determinante en la virulencia

En *F. oxysporum*, se ha demostrado que dos cepas, una mutante para el gen *pg5* codificador de ENDOPG (Garcia-Maceira, *et al.*, 2001) y la otra para el gen *pgx4* codificador de EXOPG (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000), mantenían los mismos niveles de virulencia en plantas susceptibles que cepas salvajes. Es posible que la existencia de otros genes de PG aún no caracterizados en muchos de estos casos confieran a las cepas mutantes actividad PG residual, impidiendo conclusiones determinantes. Aunque, en *C. carbonum* la obtención de un cepa con los genes de ENDOPG y EXOPG mutados sirvió para comprobar que ninguno de los dos eran necesarios para la virulencia (Scott-Craig, *et al.*, 1998) a pesar de que la actividad poligalacturonasa de la cepa mutante era menor del 1% de la presente en la salvaje.

Por otro lado, encontramos ejemplos en los que se pone de manifiesto la implicación de las PGs en el proceso de patogénesis. Tal es el caso de la ENDOPG codificada por el gen *Bcpg1* de *B. cinerea* que está involucrada tanto en los procesos de infección secundaria, como en el crecimiento de las lesiones después de la infección (ten Have, *et al.*, 1998). También se ha

observado en *Claviceps purpurea* que al mutar los dos genes codificadores de ENDOPGs se obtiene una cepa cuya capacidad de producir patogénesis en centeno está significativamente reducida (Oeser, *et al.*, 2002). También en bacterias fitopatogénas se han realizado este tipo de estudios obteniendo resultados similares (Annis y Goodwin, 1997), así en *Ralstonia solanacearum* se ha demostrado que tanto la ENDOPG como la EXOPG caracterizadas son factores de virulencia (Huang y Allen, 2000).

Como se desprende de todos estos estudios todavía existe un gran desconocimiento de cual es el papel e importancia relativa de estas enzimas, por lo que, la caracterización de nuevos genes y el estudio de su regulación tal vez sea la mejor herramienta para lograr comprender cual es su significado biológico. Por otro lado, la posibilidad de caracterizar de modo individual las propiedades físico-químicas de las PGs y sus estructuras terciarias es también un objetivo importante, pero estos aspectos dependen de la disponibilidad de enzimas producidas de forma individual que faciliten la caracterización, por lo que, la disposición de sistemas que faciliten esa purificación es un paso esencial.

Objetivos del trabajo.

El objetivo principal que nos planteamos fue el estudio de las poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* con el fin de avanzar en el conocimiento de la función que desempeñan estas enzimas en la patogénesis producida por un parásito tan importante. Se eligió la forma especial *F. oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* dado que la sintomatología que producía en la planta indicaba una gran presencia de enzimas degradadoras de pared celular y por tanto, de PGs, además de por su repercusión económica dada la falta de genes de resistencia a esta forma especial.

El primer objetivo parcial fue la caracterización de genes codificadores de poligalacturonasas. Antes del comienzo del trabajo habían sido descritas dos secuencias parciales de PGs en FORL, una de una EXOPG (Posada,

1999) y la otra de una ENDOPG (Patino, *et al.*, 1997a). Gracias a la construcción en nuestro laboratorio de una genoteca genómica de FORL, nos pudimos plantear la obtención de las secuencias completas de estos genes así como caracterizar nuevos genes codificadores de PGs. La obtención de las secuencias completas de dichos genes nos permitiría obtener una valiosa herramienta para desarrollar nuevas estrategias en el estudio de estas enzimas.

El segundo objetivo fue determinar si estos genes estaban presentes en más aislamientos de *Fusarium* y si lo estaban cual era el grado de similitud de sus secuencias.

El siguiente objetivo fue estudiar el control genético de estos genes. Determinar tanto el número de copias en los que se encontraban en el genoma de FORL, así como, su regulación en cultivos *in vitro* para comprobar si ante los mismos estímulos presentaban una regulación coordinada o no.

También, nos propusimos establecer sistemas que nos permitieran estudiar más factores implicados en su regulación. Como primer paso, y gracias a la caracterización de las secuencias completas de estos genes, podríamos realizar un análisis de las regiones promotoras para buscar nuevos elementos implicados en su regulación para posteriormente establecer un sistema que nos permitiera el estudio funcional.

Como último objetivo, nos planteamos buscar un sistema que nos permitiera la producción de las PGs de FORL (en especial de las EXOPGs debido a la menor información existente sobre ellas) para poder realizar una caracterización enzimática.

Capítulo 1

Caracterización de genes codificadores de PGs en FORL

INTRODUCCIÓN.

Las PGs forman parte de un conjunto de enzimas hidrolíticas producidas por una gran diversidad de organismos y que cumplen funciones diversas. En los hongos, estas enzimas tienen un papel clave en su nutrición permitiendo el crecimiento sobre restos vegetales (saprofitismo) y en los procesos de infección facilitando la colonización y la obtención de nutrientes. El número de enzimas y sus características parecen variar de unos hongos a otros y están influenciadas por una gran variedad de factores ambientales.

Las técnicas de interrupción de genes, así como, las de complementación de mutantes han resultado ser de gran utilidad, al menos en algunos casos para entender cuál es la función de estas enzimas en los fenómenos de patogénesis y virulencia. Existen algunos ejemplos en los que es evidente la relación de estas enzimas con la patogénesis, como en el caso del gen *Bcpg1* de *B. cinerea* (ten Have, *et al.*, 1998) y los dos genes codificadores de ENDOPGs en *Claviceps purpurea* (Oeser, *et al.*, 2002). Aun así, la mayoría de estos estudios apoyan la hipótesis de que las PGs no serían factores de virulencia (Di Pietro y Roncero, 1998; Garcia-Maceira, *et al.*, 2000; Garcia-Maceira, *et al.*, 2001; Scott-Craig, *et al.*, 1998), sino factores básicos de patogenicidad colaborando con otros genes en el éxito de la infección. De todas formas, la existencia de actividad PG residual en los mutantes (Scott-Craig, *et al.*, 1990) indicaría la presencia de más genes codificadores de PGs, como se ha comprobado en algún caso (Scott-Craig, *et al.*, 1998), que, en parte, podrían explicar los resultados negativos obtenidos.

La presencia de distintas enzimas con la misma función en los patógenos dificulta la tarea de determinar la función concreta de cada una de ellas siendo necesario la caracterización de todos los genes de PGs para poder determinar su importancia mediante las técnicas de mutación y complementación antes citadas. Por ello, la caracterización de los genes codificadores de PGs en el patógeno del tomate *F. oxysporum* f.sp. *radicis-*

lycopersici era un punto de partida necesario para estudiar el significado funcional de estas enzimas.

Estudios previos en cultivos *in vitro* demostraban la presencia de varias isoformas de PGs en FORL (Fernández, *et al.*, 1993; Guevara, *et al.*, 1997), además se detectó tanto actividad “endo” como “exo” a lo largo de los cultivos (Patino, *et al.*, 1997b). Los mecanismos de modificación postraduccionales a los que este tipo de enzimas están sometidos (Caprari, *et al.*, 1993a) producen variabilidad de isoformas, por lo que una caracterización completa de la base genética de estas proteínas sería necesaria para determinar cuanta de la variabilidad observada es debida a este tipo de modificaciones.

En el momento del comienzo del trabajo había sido aislada y purificada una EXOPG a partir de cultivos *in vitro* (Patino, *et al.*, 1997a) y se había realizado la construcción de una genoteca genómica de FORL (Posada, 1999). Los objetivos de este capítulo fueron la obtención y caracterización de las secuencias completas de los genes de PGs de FORL, así como realizar un estudio comparativo de las secuencias de estas PGs con otras PGs fúngicas. Por último nos planteamos el establecer los modelos teóricos de la estructura terciara de las proteínas. La consecución de estos objetivos nos permitiría obtener una valiosa herramienta para desarrollar nuevas estrategias en el estudio de estas enzimas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico.

Para la realización de este trabajo se utilizó el aislamiento r6 (FORL r6) del hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp *radicis lycopersici* (Jarvis y Shoemaker, 1978) obtenido a partir de cultivos monospóricos aislados de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectadas, cedidos por el Dr. J. Tello (Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA, Madrid). El hongo se mantuvo mediante resiembras periódicas en placas petri con medio de cultivo

patata-dextrosa-agar (PDA, Scharlau, España) incubadas a 25°C durante siete días y posteriormente conservado a 4°C. Se conservaron también a -80°C en glicerol al 15%.

Para realizar el clonaje de los fragmentos de DNA, se utilizó la cepa bacteriana DH5 α de *E.coli* así como las células pMOSBlue del kit pMOSBlue T-vector (Amersham Biosciences, GB). También fue utilizada la genoteca genómica con el genoma completo de FORL preparada en nuestro laboratorio (Posada, 1999) en el fago λ del kit λ EMNL 3/BamHI Vector Kit (Stratagene, Alemania).

Medios y condiciones de cultivo.

El medio de cultivo utilizado contenía por litro 1 g de NaOH, 3 g de ácido málico, 2 g de NO₃NH₄, 1 g de H₂PO₄K, 0,1 g de SO₄Mg 7 H₂O, 5 g de extracto de levadura (Cruickshank, 1983) y glucosa 1%. El hongo fue cultivado en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo líquido. Los cultivos fueron inoculados con discos de micelio de 1cm de diámetro cortados de los márgenes de colonias de 7 días e incubados a 25 °C en estático. Los micelios fueron recogidos el día 7 de cultivo por filtración a través de papel Whatman No. 1, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C para los ensayos con DNA.

Para los experimentos con RNA se inocularon matraces con este mismo medio y se incubaron 4 días a 25 °C en estático. Después se recolectó el micelio en condiciones estériles y se transfirió a nuevo medio con 1% de ácido galacturónico en lugar de glucosa, cultivándose en estático. El micelio se recogió por filtración a través de papel Whatman No. 1, a distintos tiempos se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C.

Obtención del DNA genómico.

El DNA fue extraído por el método Dellaporta, *et al.* (1983) con algunas modificaciones. El micelio congelado (1-1,5 g) fue triturado en mortero con nitrógeno líquido y transferido a un tubo de 50 ml con 6 ml de tampón HSE (10 mM Hepes pH 6,9, 0,5 M Sacarosa, 20 mM EDTA pH 8,0) y 0,3 ml de SDS 20 %. La mezcla fue homogeneizada en un vórtex e incubada a 65°C durante 15 minutos. Luego se añadió 1 volumen de TE (Tris 50 mM y EDTA 10 mM, a pH 8) y se homogeneizó por inversión. A continuación, se realizó una centrifugación a 15.000 rpm y 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se trató con 1 volumen de fenol equilibrado con Tris y a pH 7, se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 20 minutos, se pasó a tubos nuevos y se repitió la fenolización con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (PCIA; 25:24:1).

Se recogió la fase acuosa tras centrifugar en las mismas condiciones y se lavó con cloroformo antes de la precipitación con 0,2 volúmenes de acetato sódico 3,0 M pH 5,2 y 0,6 volúmenes de isopropanol durante una noche a -20 °C o 1 hora a -80 °C. Se centrifugó a 15.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 2 ml etanol al 70%. Tras una centrifugación en las mismas condiciones se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 400 µl de agua. Se transfirió a un tubo de 1,5 ml en donde se le añadió 2 µl de RNAsa A+T (10 mg/ml) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se le añadió 40 µl de acetato sódico 3,0 M pH 5,2 (1/10 volúmenes) y 240 µl de isopropanol (3/5 volúmenes). El precipitado recogido después de la centrifugación fue lavado con etanol al 70%, secado al vacío y resuspendido en 300 µl de agua. El DNA fue mantenido a -20 °C.

La concentración de DNA fue estimada por absorción a 260 nm, asumiendo que una concentración de 50 µg/ml corresponde a una unidad de densidad óptica. La integridad del DNA fue comprobada en geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE como se describe más adelante.

Electroforesis de DNA.

Se utilizaron geles de agarosa al 0,8% (para DNA genómico y plasmídico) o al 1,0 y 1,5% (para productos de PCR) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1,0 mM), y bromuro de etidio (1 µg/ml). Las muestras fueron disueltas en el tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1,0 mM y azul de bromofenol 0,25%). Los geles se corrieron en tampón TAE a voltaje constante: el DNA genómico digerido a 30 V y el DNA plasmídico y los productos de PCR a 70 V. Los marcadores de masa molecular que se usaron, fueron el fago lambda cortado con *Pst* I y el marcador Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

Obtención de sondas específicas de poligalacturonasas.

Reacciones de amplificación.

Como sondas se utilizaron los fragmentos genómicos de los genes *pgx2* y *pg1* obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Posada, 1999), así como, fragmentos genómicos obtenidos de los genes *pgx1* y *pg2* de la siguiente forma. Se diseñaron las parejas de oligonucleótidos: *pgx1up* (5' GGTCGCCGTGTCTGTTCT 3') y *pgx1rv* (5' ATTGGGCGGTTTCTCATTC 3') y *pg2up* (5' GCCGGCAGCTGCACTTTTAC 3') y *pg2rv* (5' TGTCAGAGCGTCCACCAA 3') a partir de las secuencias de los genes *pgx4* (Genebank AF083075) y *pg5* (Genbank AF078156) de FOL respectivamente. Se utilizaron estas parejas de oligonucleótidos como cebadores en sendas reacciones de PCR utilizando como molde 150 ng de DNA genómico de FORL. Para realizar las amplificaciones se utilizó el termociclador Peltier PTC-100 (M.J. Research Inc., USA) con el siguiente programa: un paso previo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C seguido de 32 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 52 °C (anillamiento) y 2 minutos a 72 °C (extensión). Por último, un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C y parada a 4 °C. Se utilizó la enzima Taq polimerasa (Ecogen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Clonación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.

Los productos de amplificación de ambas reacciones se comprobaron en geles de agarosa al 1% obteniéndose una banda de aproximadamente 630 pb cuando se utilizaron los cebadores del gen *pgx4* (Genebank AF083075) de FOL, y otra de 680 pb en la amplificación con los cebadores del gen *pg5* (Genbank AF078156) de FOL. Ambas bandas se cortaron y se purificó el DNA de la agarosa mediante el kit Gelex DNA Extraction kit (CAMGEN, Gran Bretaña) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se comprobó el estado del DNA y su concentración en geles de agarosa al 1% después de la purificación.

Se clonaron los productos de amplificación *pgx1 up-rv* y *pg2 up-rv* en el plásmido pMOSBlue del kit pMOSBlue T-vector (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) siguiendo las instrucciones del fabricante. La selección de colonias transformadas se realizó cultivando las células durante 16-22 horas a 37 °C en placas petri con LBA (LB más ampicilina 50 mg/ml) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-GAL, Genotek, España) e isopropil-tio- β -D-galactósido (IPTG, Genotek, España).

Las colonias blancas seleccionadas se cultivaron en 1,5 ml LBA líquido durante 18 horas a 37°C y 225 rpm para la extracción de DNA plasmídico, la cual se realizó según Sambrook, *et al.* (1989).

El DNA plasmídico se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción *Pst* I y *EcoR* I (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) en presencia de 1 μ l RNAsa A+T1 preparada según el protocolo descrito por Sambrook, *et al.* (1989) en el tampón indicado por el fabricante a 37 °C durante 4 horas. Las digestiones se visualizaron en un gel de agarosa para comprobar la presencia del inserto deseado.

Se seleccionó una colonia para su secuenciación. Se cultivó en matraces de 50 ml con 20 ml de LBA a 37°C durante 16 horas. El DNA plasmídico fue extraído con el kit High Pure Plasmid Isolation Kit (ROCHE Applied Science, Alemania) según las especificaciones del fabricante.

Los fragmentos clonados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid con el secuenciador de DNA ABI-PRISM (Applied Biosystems, USA) según las indicaciones del fabricante.

Preparación y marcaje de las sondas.

Los fragmentos genómicos de los genes *pgx2* y *pg1* (Posada, 1999), así como, los fragmentos genómicos obtenidos en FORL de los genes *pgx1* y *pg2* fueron utilizados como sondas para realizar los escrutinios de la genoteca genómica. Para ello, se digirieron los plásmidos donde estaban clonados con las combinaciones de enzimas descritas anteriormente y se separaron los insertos, correspondientes a los fragmentos genómicos de cada uno de los genes, en geles de agarosa al 1%. Se eluyeron los fragmentos de la agarosa con el kit Gelex DNA Extraction kit (CAMGEN, Gran Bretaña) siguiendo las indicaciones del fabricante.

35 ng de cada fragmento fueron marcados por cebamiento al azar con el sistema de marcaje rediprime (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) con ^{32}P -dCTP (actividad específica de 3000 Ci/mmol) a 37°C durante 30 minutos.

Escrutinio de la genoteca genómica.

Preparación de células bacterianas.

Se inoculó la cepa de *Escherichia coli* XL1MRA (P2) del kit λ EMNL 3/BamHI Vector Kit (Stratagene, Alemania) en 50 ml de LB con 0,5 ml de MgSO_4 1 M y 0,5 ml de maltosa al 20% (MgSO_4 10 mM y Maltosa 0,2%) y se cultivó a 37 °C y 225 rpm. Se controló el crecimiento hasta que el cultivo llegó a una medida de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda entre 0,5 y 1. El cultivo se centrifugó a 200 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en MgSO_4 10 mM, hasta obtener una concentración de densidad óptica a 600 nm de 0,5. Se hicieron alícuotas

de 150 µl de las células en tubos de 1,5 ml y se conservaron en frío hasta el momento de la infección.

Infección de las células bacterianas con los fagos.

Se infectaron 150 µl de células, preparadas como se ha descrito, con diferentes cantidades de los fagos y se incubaron 15 minutos a 37 °C en el agitador orbital a 120 rpm. Se añadieron 5 ml de LB-agarosa (0,7%) fundido y se extendieron sobre placas de LB-agar de 135 mm de diámetro (AFORA, España) incubándose a 37 °C de 8 a 12 horas. Después, se mantuvieron las placas 2 horas a 4 °C antes de transferir los fagos a membranas de nylon.

Transferencia de los fagos a membranas de nylon.

Se eligió una placa de lisis para cada una de las sondas y se transfirió a dos membranas de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences, Gran Bretaña). Para ello se marcó cada placa de forma asimétrica y se mantuvo la primera membrana sobre la placa de lisis 2 minutos y la segunda 4 minutos, marcándose en los extremos en los mismos lugares que la placa. Las membranas se lavaron 2 minutos en una solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M), 5 minutos en una solución neutralizante (NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 0,5 M pH 7,2) y 30 segundos en 2XSSC. Se secaron al aire 30 minutos y se fijó el DNA a la membrana a 80 °C durante 2 horas.

Hibridación de los filtros con sondas de poligalacturonasas.

Las membranas se prehibridaron a 42 °C durante 2,5 horas en una solución de formamida 50%, SSPE 5% (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM y EDTA 5 mM a pH 7,7), Denhardt 5% (Ficoll 0,02% polivinilpirrolidona 0,02% y albúmina de suero bovino 0,02%), SDS 0,5% y 500 µg de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 42 °C durante 24 horas en una solución idéntica a la anterior con 30 ng de las sondas correspondientes a los genes *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2* marcadas y

desnaturalizadas. Se realizaron dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en SSPE 2X y SDS 0,1%, un lavado de 15 minutos a 42 °C en SSPE 0,2X y SDS 0,1% y por último un lavado de 15 minutos a 55 °C en SSPE 0,2X y SDS 0,1%. La detección se llevó a cabo mediante la exposición de un filtro hibridado con la película Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) a -80 °C en oscuridad durante 4 horas. Posteriormente se determinó la posición del filtro en la película, marcándola en las mismas posiciones en las que se marcó el filtro.

Escrutinio de la genoteca con cada una de las sondas de PGs obtenidas.

Los escrutinios de la genoteca genómica se realizaron según el protocolo descrito en el kit λ EMNL 3/BamHI Vector Kit (Stratagene, Alemania). Para comenzar los escrutinios con las diferentes sondas de los genes codificadores de poligalacturonasas se infectaron las células *Escherichia coli* P2 con alícuotas de la genoteca genómica de FORL r6 (Posada, 1999) que contenían 20000 unidades formadoras de placas (ufp) (8 equivalentes genómicos) de la forma descrita previamente.

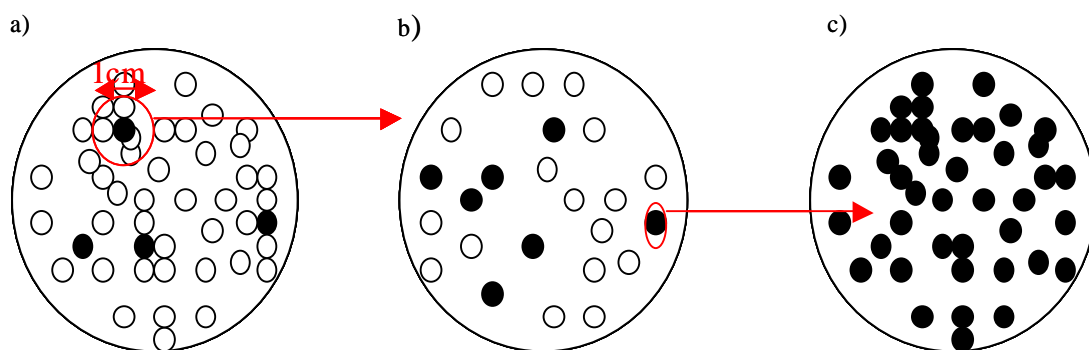


Figura 1.1: Esquema de la realización del escrutinio de la genoteca genómica. Se parte de una placa con 20000 ufp que es transferida a membrana de nylon e hibridada con la sonda correspondiente. Se identifican las zonas donde se encuentran los halos positivos y se corta un círculo de 1cm de diámetro (a) con el que se vuelve a infectar hasta obtener un fago positivo aislado (b) que produzca en el último escrutinio (c) todos los halos positivos.

Se prepararon 4 placas con este número de fagos que se transfirieron a membranas, se hibridaron con las sondas correspondientes a los genes *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2*. Se determinó la presencia de clones positivos mediante la

exposición de cada uno de los filtros con la película Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Gran Bretaña). Se identificaron los clones positivos en cada una de las placas superponiendo la película sobre la placa de forma que la orientación de las marcas fuese la misma y se corto 1 cm² de la placa alrededor de cada recombinante positivo (Figura 1.1a). Se resuspendieron mediante fuerte agitación en 1ml de tampón SM (5,8 g/l NaCl, 2g/l MgSO₄·7H₂O, 50 ml/l Tris HCl 1M pH 7,5, 5 ml/l Gelatina 2% p/v) al que se añadieron 20 µl de cloroformo. Se conservaron a 4°C hasta que se realizó el segundo escrutinio.

Se eligió un clon positivo para cada uno de los genes *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2* y se hicieron diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) de cada fago con buffer SM. Se infectaron células *E.coli* P2 con 4 µl de cada una y se prepararon nuevamente placas. Se transfirieron a membranas de nylon sólo aquellas que presentaban halos de lisis muy bien separados y se eligieron las placas obtenidas con las diluciones 10^{-8} para la sonda correspondiente a *pgx1*, 10^{-1} para *pgx2*, 10^{-7} para *pg1* y 10^{-5} para *pg2*. Se hibridaron los filtros con las sondas correspondientes y se identificaron los clones positivos en las placas. Se recuperó un clon positivo para cada sonda con la punta de una pipeta pasteur estéril con el fin de obtener un único halo de lisis (Figura 1.1b) excepto para la sonda correspondiente al gen *pg2* en el que no pudo recuperarse un único halo de lisis.

Se volvieron a resuspender enérgicamente los fagos en 1 ml de tampón SM con 20 µl de cloroformo y conservados a 4 °C. Se hicieron diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}) a partir de cada fago positivo, se infectaron células de *E.coli* P2 con 4 µl de cada una y se prepararon nuevamente placas del modo previamente descrito. Las placas obtenidas con las diluciones 10^{-1} para las sondas correspondientes a los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* y la dilución 10^{-3} para la correspondiente al gen *pg2*, fueron transferidas a membranas de nylon. Se hibridó cada filtro con su sonda correspondiente. Se comprobó que todos los halos de lisis aparecidos en las placas correspondientes a los filtros hibridados con la sondas de los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* fueron positivos.

En el caso del gen *pg2* fue necesario un nuevo escrutinio, por lo que, se recuperó uno de los halos de lisis con la punta de la pipeta pasteur y se resuspendió en 1 ml de tampón SM con 20 μ l de cloroformo. Se hicieron diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}) a partir del fago positivo, se infectaron células de *E.coli* P2 con 4 μ l de cada una y se prepararon nuevamente placas y se transfirió la correspondiente a una dilución 10^{-1} mediante el proceso previamente descrito. Se comprobó que esta vez todos los halos de lisis producían señal al hibridar el filtro con la sonda del gen *pg2*.

Titulación y amplificación de los fagos positivos.

Se hicieron diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}) de los fagos que en el último escrutinio produjeron todos los halos de lisis positivos y se contaron las ufp para titular cada uno de los clones genómicos. Se denominaron: λ_{pgx1} al fago obtenido mediante el escrutinio de la genoteca genómica con la sonda del gen *pgx1*, λ_{pgx2} al obtenido con la sonda de *pgx2*, λ_{pg1} al obtenido con la sonda del gen *pg1* y λ_{pg2} al obtenido con la sonda del gen *pg2*. Para amplificar cada uno de los clones positivos, se infectaron 300 μ l las células de *E.coli* preparadas con 500 μ l de cada uno de los fagos (λ_{pgx1} , λ_{pgx2} , λ_{pg1} y λ_{pg2}) y se plaquearon como se ha descrito.

Se añadieron 10 ml de tampón SM a cada placa y se mantuvieron las placas a 4 °C durante toda la noche para que el fago difundiera en el tampón. Se recogió la suspensión del fago y se le añadió cloroformo a una concentración final de 5% (v/v), se eliminaron los residuos por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, se añadió cloroformo a una concentración de 0,3% (v/v) y se guardó el fago en esta suspensión a 4 °C. Se guardaron alícuotas de 1 ml a -80°C de cada uno de los fagos positivos añadiendo DMSO al 7% (v/v).

Se titularon las amplificaciones de cada uno de los fagos utilizando el mismo sistema y obteniéndose las siguientes concentraciones de fagos:

900000 ufp/ml para el fago λ_{pgx1} , 40000 ufp/ml para el λ_{pgx2} , 40000 ufp/ml para λ_{pg1} y 10000 ufp/ml para λ_{pg2} .

Obtención de las secuencias genómicas de los genes de PGs.

Extracción de DNA de los fagos positivos.

Se prepararon 5 placas de cada clon genómico infectando células de *E.coli* con 5×10^4 ufp por cada placa. Se recogieron 50 ml de suspensión de cada fago positivo y se mezclaron con EDTA 0,5M a una concentración final de 10mM y con SDS 20% a una concentración final de 0,2%. Se agitó la mezcla y posteriormente se añadió 4 mg de proteinasa K (Boehringer Mannheim, USA) y se incubó durante una hora a 56 °C. Tras la digestión con proteinasa K se añadió un volumen de PCIA 25:24:1 y se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente agitando el tubo suavemente por inversión. Se centrifugó 5 minutos a 8000 rpm. Se recuperó la fase acuosa a nuevos tubos y se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (CIA; 24:1) se agitó y se repitió la centrifugación. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos donde se añadió 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 7 y se mantuvo 5 minutos en hielo. Después se añadió un volumen de isopropanol y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos en frío y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 400 μ l de H₂O mili Q. El DNA fue visualizado y cuantificado en cada caso en un gel de agarosa al 1%.

Digestión del DNA de los fagos .

Se digirió de forma individual 600 ng del DNA de cada uno de los fagos λ_{pgx1} , λ_{pgx2} , λ_{pg1} y λ_{pg2} con diferentes enzimas de restricción y con combinaciones de ellas: *EcoRI*, *PstI*, *XhoI*, *AluI*, *SalI* (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) en un volumen de 500 μ l y en las condiciones necesarias para cada una descritas por el fabricante. Posteriormente se precipitó con un volumen de isopropanol y se obtuvo el precipitado por centrifugación en frío a

12000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendieron las digestiones en 25 μ l de agua miliQ para visualizarlas en geles de agarosa al 0,8% y se transfirieron a membranas de nylon (Figura 1.2).

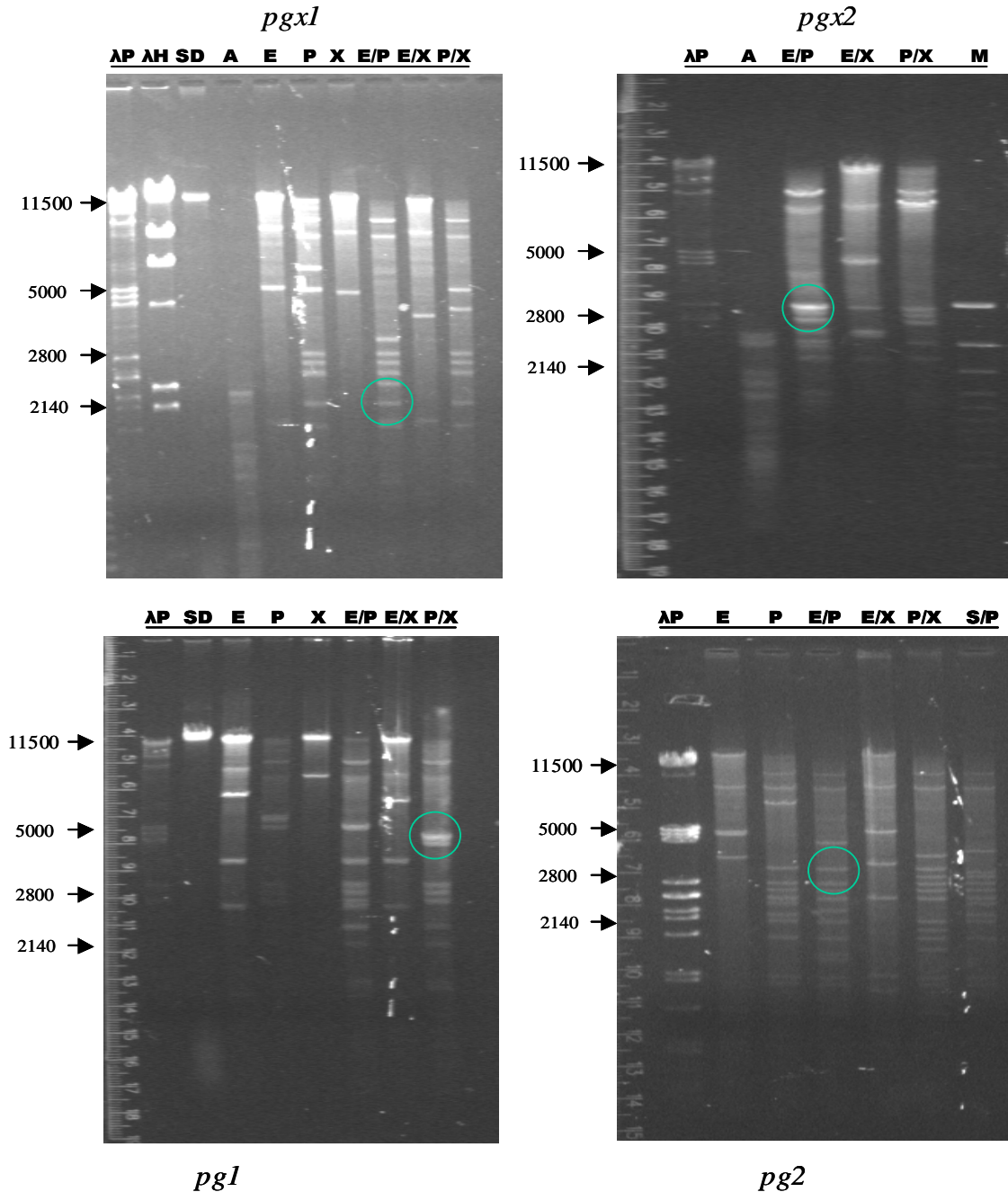


Figura 1.2: Digestiones de los clones genómicos λ_{pgx1} , λ_{pgx2} , λ_{pg1} y λ_{pg2} . En verde se señalan las bandas que fueron positivas en el *Southern blot* al utilizar las sondas correspondientes y que fueron subclonadas en un vector bacteriano. λ P: DNA fago Lambda digerido con Pst I, λ H: DNA fago Lambda digerido con Hind III, SD: DNA del clon genómico sin digerir, M: marcador de 100 pb, A: *Alu*, E: *EcoR*I, P: *Pst* I, X: *Xho*I, S: *Sal*I.

Transferencia de DNA.

El DNA se transfirió según Sambrook, *et al.* (1989). El gel fue incubado en agitación durante 45 minutos en una solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) y durante 30 minutos en una solución neutralizante (NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 0,5 M pH 7,2). La transferencia del DNA se realizó por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) con una solución 20XSSC (NaCl 3,0 M y acetato sódico 0,3 M pH 7,0) durante una noche. Una vez retirado el gel, la membrana fue lavada en una solución 2XSSC y secada al aire durante 30 minutos. El DNA fue fijado a la membrana a 80 °C durante 2 horas.

Hibridaciones y detección de bandas positivas.

Las membranas con el DNA digerido se prehibridaron a 40 °C durante una noche en una solución de formamida 50%, SSPE 5% (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM y EDTA 5 mM a pH 7,7), Denhardt 5% (Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02% y albúmina de suero bovino 0,02%), SDS 0,5% y 500 µg de esperma de salmón desnaturalizado.

Las hibridaciones se llevaron a cabo a 40 °C durante 24 horas en una solución idéntica a la anterior con las mismas sondas de los genes *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2* utilizadas para realizar los escrutinios. 35 ng de cada sonda fueron marcadas por cebamiento al azar con el sistema de marcaje rediprime (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) con ³²P-dCTP (actividad específica de 3000 Ci/mmol) a 37 °C durante 30 minutos.

Se realizaron 2 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en SSPE 2X y SDS 0,1%, 1 lavado de 15 minutos a 55°C en SSPE 2X y SDS 0,1% y 1 lavado de 15 minutos a 55°C en SSPE 0,2X y SDS 0,1%. La detección se llevó a cabo mediante la exposición del filtro hibridado con la película Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) a -80°C en oscuridad.

Subclonaje de las bandas positivas.

Para cada de los clones genómicos λ_{pgx1} , λ_{pgx2} , λ_{pg1} y λ_{pg2} se eligió una combinación de enzimas que rindiera un fragmento de un tamaño adecuado para ser clonado en un vector bacteriano y lo suficientemente grande para aumentar la probabilidad de que estuviera la secuencia genómica completa del gen correspondiente. Por ello, se eligieron los fragmentos *EcoR* I/*Pst* I de aproximadamente 2200 pb para el gen *pgx1*, 3000 pb para *pgx2* y 3600 pb para *pg1* y el fragmento *EcoR* I/*Xho* I de aproximadamente 3100 pb para el gen *pg2* (Figura 1.2). Una vez elegida la combinación de enzimas más adecuada se incubaron 1400 ng del DNA de los fagos λ_{pgx2} , λ_{pg1} , y λ_{pg2} , y 2800 ng de DNA de fago λ_{pgx1} , con las enzimas correspondientes en un volumen de 500 μ l y en las condiciones necesarias para cada una descritas por el fabricante. Posteriormente se precipitó con un volumen de isopropanol y se obtuvo el precipitado por centrifugación en frío a 12000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendieron las digestiones en 25 μ l de agua miliQ para visualizarlas en geles de agarosa al 0,8%. Se cortaron las bandas y se purificó el DNA de la agarosa mediante el kit Gelex DNA Extraction kit (CAMGEN, Gran Bretaña) según las indicaciones del fabricante. Se comprobó el estado del DNA y su concentración en geles de agarosa al 1% después de la purificación. Se efectuó el ligamiento de 10 ng de cada DNA obtenido con 10 ng del plásmido Bluescript SK- (Stratagene, Alemania) y la transformación de la cepa de *E.coli* DH5 α según Sambrook, *et al.* (1989).

La selección de colonias, la obtención de DNA plasmídico y la secuenciación se llevaron a cabo con los métodos descritos en el apartado “Obtención de sondas específicas de poligalacturonasas”.

Obtención de las secuencias del cDNA

Medios de cultivo y obtención del RNA.

El RNA para las transcripciones inversas se obtuvo a partir de 1 g de micelio de FORL r6 obtenido a las 24 h en el medio anteriormente descrito (Cruickshank, 1983) suplementado con 1% de galacturónico. Para extraer el RNA se utilizó el kit Total Quick RNA (TALENT, Italia) según las instrucciones del fabricante.

Todas las soluciones y el agua utilizadas se trataron con dietilpirocarbonato (1 µl DEPC/ 1 ml solución) durante 24 horas a 37 °C y luego esterilizadas a 121 °C durante 20 minutos en el autoclave.

Transcripciones inversas (RT-PCR).

La transcripciones inversas para los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg2* fueron realizadas con el kit GeneAmp RNA Gold PCR Reagent kit (Applied Biosystems, USA) a partir de 1 µg de RNA total. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 5,0 mM, 250 µM de cada nucleótido, inhibidor de la RNAsa 0,5 U/µl, transcriptasa inversa 1,5 U/µl y oligo-d(T)₁₆ 1,25 µM en el tampón indicado por el fabricante, en un volumen total de 30 µl. La reacción de amplificación consistió en un ciclo de 20 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y parada a 5 °C y se llevó a cabo en un termociclador Peltier PTC-100 (M.J. Research Inc., USA). El cDNA fue mantenido a 4 °C. Se utilizó el kit GeneRACER Kit (Invitrogen, Gran Bretaña) para realizar la transcripción inversa del RNA del gen *pg2* según las instrucciones del fabricante.

A partir de la secuencia genómica de los genes *pgx1* y *pgx2* de FORLr6 se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos para amplificar sobre el cDNA obtenido como se ha mencionado anteriormente. Los cebadores usados fueron *pgx1*-1F 5'- ATG TTG TTC AAT AAC -3' y *pgx1*-1622R 5'-CTA TCC ATT GGT TGT-3' en el caso del gen *pgx1* y los oligos *pgx2*-1F 5'- ATG AAG GTC TCG AGC TTC TTC TC-3' y *pgx2*-1589R 5'- TTA ACC GTT GAA CTT ACT AAC C-3' para el gen *pgx2* sintetizados por Amersham Biosciences, Gran Bretaña. Para el gen *pg2* se utilizó el oligo *pg2* 673F 5'-GGT ACC AAC ATC ACC TTC

AC-3' y el oligo GeneRacer 3' Primer (5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3') presente en el kit GeneRACER Kit (Invitrogen, Gran Bretaña).

En cada reacción de amplificación se utilizaron 4,5 µl de cDNA y la enzima ampliTaq polimerasa (Applied Biosystems, USA) según indicaciones del fabricante (2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada nucleótido y 1 µM de cada oligonucleótido cebador). Para llevar a cabo la amplificación se utilizó un termociclador Peltier PTC-100 (M.J. Research Inc., USA) con el programa de amplificación descrito a continuación: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C y 2 min a 72 °C; seguidos de 5 min de extensión final a 72 °C y parada a 4 °C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. Se obtuvo una única banda de un tamaño aproximado de 1350 pb en el caso de *pgx1*, 1400 pb en el caso de *pgx2* y 660 pb para la amplificación con los oligos pg2 673F y GeneRacer 3' Primer. Las bandas fueron cortadas y el DNA purificado con el kit High Pure PCR product purification kit (ROCHE Applied Science, Alemania) según las indicaciones del fabricante.

Cada banda, una vez purificada, se clonó con el kit de clonación para productos de PCR pMOSBlue (Amersham Biosciences, Gran Bretaña). El ligamiento se realizó durante 20 horas a 22 °C y las células competentes (MOSBlue) fueron transformadas siguiendo siempre las instrucciones del fabricante.

La selección de colonias transformadas, la purificación del DNA plasmídico y la secuenciación se realizaron como está descrito en el apartado clonación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.

Análisis de secuencias.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con los programas EditSeq y MegAlign del paquete informático DNASTAR (Lasergene, USA). La

determinación preliminar de la similitud de secuencia se realizó mediante el programa BLASTx, BLASTn y BLASTp ofrecido por el servidor GenBank (Benson, *et al.*, 2002) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se utilizaron, asimismo, las bases de datos SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Nielsen, *et al.*, 1997) y NetNGlyc 1.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> (Gupta, *et al.*, 1999) para determinar la presencia y longitud del péptido señal y los lugares de glicosilación teóricos respectivamente.

Para el modelizado de proteínas se utilizó el servidor SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Schwede, *et al.*, 2003). Se utilizaron como modelo las estructuras de las PGs fúngicas de *F. moniliforme* (Acces. 1HG8), *A. aculeatus* (Acces. 1IA5) y *A. niger* (Acces. 1CZF).

Para visualizar y manipular las estructuras obtenidas se utilizó el programa Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997).

RESULTADOS

Obtención de sondas de genes codificadores de PGs.

La obtención de secuencias codificadoras de PGs en FORL se realizó mediante el escrutinio de la genoteca genómica del aislamiento de FORL r6, utilizando cuatro sondas diferentes correspondientes a los genes de PGs de FORL *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2*.

En el caso de los genes *pgx2* y *pg1* se utilizaron como sondas fragmentos de 753 pb y 750 pb, respectivamente, obtenidas mediante PCR del DNA genómico de FORL en nuestro laboratorio (Posada, 1999). La sonda del gen *pgx2* se había obtenido utilizando oligonucleótidos cebadores degenerados diseñados a partir de las secuencias del extremo N-terminal y de la secuencia

interna obtenida después de la hidrólisis con tripsina de la proteína nativa PGX2 (Patiño, 1998). La sonda de gen *pg1* se obtuvo con oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de endopoligalacturonasa que había sido descrita en *Fusarium moniliforme* por Caprari (Caprari, *et al.*, 1993b).

Para realizar el escrutinio del gen *pgx1* se utilizó un fragmento obtenido por PCR utilizando dos oligonucleótidos cebadores (*pgx1up* y *pgx1rv*) diseñados a partir de la secuencia del gen *pgx4* de un aislamiento de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (García-Maceira, *et al.*, 2000). El fragmento obtenido era de 637 pb y presentó una homología del 98% con la secuencia aminoacídica del gen *pgx4* (Genebank AF083075) de FOL, mediante el programa BLASTX (Altschul, *et al.*, 1997).

La descripción de una nueva secuencia de ENDOPG en FOL (*pg5*) (García-Maceira, *et al.*, 2001) permitió diseñar nuevos cebadores para obtener una nueva sonda. Se diseñaron dos oligonucleótidos cebadores a partir de esta secuencia y se amplificó el DNA genómico de FORL. Se obtuvo un producto de amplificación de 682 pb cuya homología, obtenida con el programa BLASTX, con la región correspondiente del gen *pg5* fue del 81%.

Aislamiento y caracterización de las secuencias de nucleótidos de cuatro genes de PGs de FORL.

Caracterización del gen *pgx2*.

Se realizó el escrutinio de la genoteca genómica con la sonda correspondiente al gen *pgx2* de FORL. En el primer escrutinio se obtuvieron 5 fagos positivos de los cuales se eligió sólo uno para continuar con los escrutinios. Una vez finalizados, se extrajo el DNA del clon y se digirió con diversas combinaciones de enzimas de restricción. Se determinó mediante *Southern blot* que fragmentos presentaban la región que hibridaba con la sonda del gen *pgx2* y se seleccionó uno de un tamaño adecuado para subclonarlo en un vector bacteriano. El fragmento elegido resultó de una longitud de 2,801 Kb

con un marco abierto de lectura de 1,589 Kb y unas regiones no codificadoras de 668 bp aguas arriba (upstream) y de 544 bp aguas abajo (downstream) (Figura 1.3a). La región codificadora del gen se estimó mediante RT-PCR resultando de una longitud de 1400 pb. La comparación de la secuencia genómica con la del cDNA permitió determinar la localización y tamaño de los intrones. En la secuencia del gen *pgx2* se detectaron cuatro intrones cuyas longitudes oscilaban entre 46 y 50 pb. La secuencia completa del clon analizado (GenBank AF136444), así como, la secuencia de aminoácidos deducida utilizando el programa EditSeq (Lasergene, USA) se representa en la figura 1.3a.

La secuencia del gen *pgx2* se comparó con otras secuencias presentes en el banco de datos GenBank (Benson, *et al.*, 2002) mediante el programa MegAlign (Lasergene, USA) mostrando un porcentaje de similitud entre el 27,9 y 49,8 % con las otras EXOPGs descritas en hongos filamentosos tales como las codificadas por los genes: *pgx4* de FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000), *pgaX* de *Aspergillus tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996), *pgx1* de *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998), *pgx* de *Botryotinia fuckeliana* (Genbank AF145229) y el gen *exopg* descrito en *A. nidulans* (GenBank AY237304).

La secuencia de aminoácidos deducida forma una proteína de 464 aminoácidos, con una masa molecular de 51,7 kDa y un punto isoeléctrico de 8,27 (Tabla 1.1). Mediante la utilización del programa SignalP V1.1 (Nielsen, *et al.*, 1997) se determinó la presencia de un péptido señal de 18 aminoácidos, con un punto de corte situado entre ¹⁸Ala y ¹⁹Glu. También se pudo comprobar la existencia de un punto de corte para la proteasa KEX 2 (Julius, *et al.*, 1984) en la posición ⁴⁵Lys-⁴⁶Arg. La masa molecular de la proteína deducida, a partir de la secuencia de aminoácidos posterior al lugar de corte de la proteasa KEX es de 46,6 kDa, valor que se aproxima al obtenido experimentalmente (50 kDa) para la proteína madura desglicosilada (de las Heras, *et al.*, 2003). Por medio del programa NetNGlyc 1.0 (Gupta, *et al.*, 1999) se determinó la presencia de 9

posibles sitios de glicosilación en las posiciones 115, 184, 224, 262, 274, 328, 353, 365 y 373.

tctcgcgatgatgtccgtccgtagataagtcggtcctaccagtaccagggttaca	-615
tctaaagttctttatccttaagtttaattacaactctgaagcccacgacagggt	-561
cacgcccagccgcacgagcatccagaccgcttaacccaaaatcatgggtgccttc	-507
aacaaaaacgctaattcttgaattttagaagaaactgtcatcccttctca	-453
aacagtcgatccggtacgcttgccccctcgaattttaacggtggggttgcg	-399
gggaattacctttgcagcgttcaatgggggggggtgatctaccgctaagaatg	-345
gggaaatacagctccacgggaactctgagccgcggataatttactgtccacgaa	-291
tgagaagctgcccgtgggaaacaagcttattcagagaaccactgtagacgacgc	-237
tctgttagcgaatacaacttccaatctgggggttgtaacttttttgacatg	-183
agacgaggagcattaaactagctatgcggttagaccgcttgagaaactgggg	-129
gtcatgtattcgggagtagctccgaaatgatcatccagctcttgaataaac	-75
ctctaaacatccctatgtttcttttcttctgatcctcaagccaactcatctct	-21
gcactgacaatcttttcacaATGAAGGTCTCGAGCTTCTTCTCAACCCCTCTCC	34
<u>M K V S S F F S T L S L</u>	12
TCTTCGCAGGCGTTCTCGCCGAGGCCATCGACCTCCCTGCCGGTGTTCCTCGCA	88
<u>F A G V L A E A I D L P A G V P R S</u>	30
GCATTGAAGAGTTCCGCGCCAAGCATCCCTATGAACTTCCCCTCAAGAGAAGTC	142
<u>I E E F R A K H P Y E L P V K R S H</u>	48
ATCGCAAGGTCTACACTATCAGACATAGTAAGAACGACAACGATGATGTCTCGT	196
R K V Y T I R H S K N D N D D V S S	..66
CAGACTTCTATAAGGGTTGAAGAAGGCGAACAAGGGAGGTACTCTGTACCTCC	250
E F Y K G L K K A N K G G T L Y L P	84
CCAAGGGTCAGACTTTTGTTCATTGGAAAAGCCCTTGATCTCACCTTTTTGAATG	304
K G Q T F V I G K P L D L T F L N D	102
ATATTCATGTTTCATCTTGAGGGTGAGATTAAGTTTACCAATGATACGGAGTATT	358
I H V H L E G E I K F T N D T E Y W	120
GGCAGAAGAATGCTTATAAGCATCCTTTCCAGgtatgtagtactgaaaccttcatg	412
Q K N A Y K H P F Q	130
atgagttgagactaatgggttagtagAACTCGATCATGTTCTGGAAGTGGGGTGGC	466
<u>N S I M F W K W G G</u>	140
AAGAACATCAAGCTTTACGGAAAGGGTGTCTGAAACGGTAACGGTCAGCGATGG	520
K N I K L Y G K G V L N G N G Q R W	158
TGGAACGgtatgaccccctcttatcatatttttaggtcatattctaacaatatgca	574
W N E	161
gAGTTTGCCGCAAGGAGATTCTTGACACTACCAACGCCCTACCTCCGACCTATT	628
F A G K E I L D T T N A Y L R P I	178
CTGTTCTATGCTCAGAACGCCACCAACCTGGACATCCAGGGAGTTCACTTCAAG	682
L F Y A Q N A T N L D I Q G V H F K	196
GACTCCCCCTGCTGGACCAATTTGTCTGTCACCTgtaaggaaccctagccaagt	736
D S P C W T N F V V T S	208
cctgatgatcatgtagtactgatattcttcttagCCAAGGACATCTCGTTCAAGGACG	790
<u>K D I S F K D V</u>	216
TCATCTGCACTGCTCGCTCCACCAACGCCACTGCTCTTCCCAAGAACACTGACT	844
I C T A R S T N A T A L P K N T D F	234
TCTTTGACTCCCTGAACGTTGAGAACCTCAATGTTGAGCGTGCCTGGGTTGACA	898
F D S L N V E N L N V E R A W V D I	252
TTGGTGATGATTGCTTCTCCCCAAGAGCAACGCCACCAACGTCCACGTCGACA	952
G D D C F S P K S N A T N V H V D T	270
CCATGTACTGTAACGgtaagctcactccactcctcgcacatagcttttact	1006
<u>M Y C N G</u>	275
aataaccttagGCACCCACGGTCAGTCCATTTGGCTCTCTCGGCCAGTACAAGGG	1060
<u>I H G Q S I G S L G Q Y K G</u>	289
CGAGATGTCCTTCGTCAAGGACGTCGTCATCGAGAACGTCGTGGATGCTCAACGG	1114
E M S F V K D V V I E N V W M L N G	307
CCAACACGGCGCCGCTCTCAAGACCTGGGCCGGCCCCGACATCGGCTACGGCTT	1168
Q H G A R L K T W A G P D I G Y G F	325

CATCGACAACGTGACCTTCCGCAACTTCTGGGGCGGCAACAACGAGTACACCGC	1222
I D N V T F R N F W G G N N E Y T A	343
CTTCATCGACTCGTGTACTTCAACATCAACGCTACTACTTGCGCCAGTACCC	1276
F I D S C Y F N I N A T T C A Q Y P	361
CTCTCGCATGAACATCACAAACATTCTCTTCGAGAACTTTACTGGTTACAGCTC	1330
S R M N I T N I L F E N F T G Y S S	379
CGGCAAGTACGGTAACGCTGTTGCCAAGTTGACTTGCTCGACTAGCAAGGATGC	1384
G K Y G N A V A K L T C S T S K D A	397
TGTCTGTGAGAACATCAAGTTTAAGGACTTTAACATCAAGACTCCTTGTGGTGG	1438
V C E N I K F K D F N I K T P C G G	415
AGATCCTGTGTTCTTGTGTGATGGTGTAAAGATATCGGTGTGGATTGTGTTAG	1492
D P V F L C D G V K D I G V D C V S	433
TGCTACTAGTAGCGCGGTAAGGCTGCTTTGGCGAATAAGTGTGTTGCGCCTCA	1546
A T S T A G K A A L A N K C V A P Q	451
GGCTTCTGCGAGCCCTTTCAAGGTTAGAAAAGTTCAACGGTTAAGagatgagggg	1600
A S A S P F K V R K F N G Stop	464
ggttggggtaattagtggtgtacgatgaatgagatatcgatggcttttggccat	1654
tgactttgacttttgaaaatttgaataaccaactgtgatatcttctgtggctcaa	1708
gctcgtagagagccagaaacatttcttgcgagaagtaagaatcatgcaagaa	1762
caaggtcaaggttgaagggataggttgaagggataggttcgagaaacgaagttg	1816
ccattttgatggatctggaatgctggataaataccttgagcaagtcgatcttac	1870
caacggacctactatgttacagaacttgtttaattcttctgtagcaciaaagcga	1924
tttgaattttgatggcgtaaatgctgttaagaatcaaagattggtttgcatgta	1978
acctagtagttaggaaacatcgccaggttgaataaaagtgataatttggggcttt	2032
agattttacacggcaaaagaactgaagtgcttgaacaataacgaaacactgtaa	2086
gaagctgagcttgcagtcctcagtgaaagaaataaaccagaataa	2133

Figura 1.3a: Secuencia de nucleótidos del gen *pgx2* de FORL y secuencia de aminoácidos deducida con el programa EditSeq (DNAStar, USA). Las regiones no codificadoras están en minúsculas, las teóricas cajas CAAT se señalan en rojo, TATA en rosa y la secuencia que rodea al codon de inicio ATG en azul. En naranja se señala la hipotética secuencia de comienzo de la transcripción. Los aminoácidos que forman el péptido señal están subrayadas con doble línea y los que van hasta la zona de corte de KEX con línea sencilla. Los supuestos lugares de glicosilación están en negrita y subrayados. En los intrones las secuencias implicadas en su procesamiento están en negrita. En verde se señala la hipotética secuencia de poliadenilación.

Caracterización del gen *pgx1*.

Se realizó el escrutinio de la genoteca genómica de FORL con la sonda correspondiente a el gen *pgx1* y se procedió de la misma forma que en el caso de *pgx2* para obtener la secuencia completa del gen. El fragmento elegido presentó un tamaño de 2296 pb con un marco de lectura abierto de 1622 pb y con unas regiones no codificadoras de 631 pb aguas arriba y 43 bp aguas abajo. La secuencia codificadora completa del gen *pgx1* se comparó con el programa BLASTX con otras secuencias presentes en el GenBank (Benson, *et al.*, 2002). Se observó que dicha secuencia mostraba una identidad del 90% con la *pgx4* de FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000) pero a pesar de la elevada similitud entre los dos genes, se apreciaron cambios significativos de perdida y

recuperación del marco de lectura en las regiones correspondientes a la región C-terminal de ambas proteínas. Debido a estas diferencias entre ambas secuencias decidimos denominar al gen caracterizado en FORL *pgx1* para distinguirlo del caracterizado en FOL *pgx4*. Mediante RT-PCR se obtuvo una banda de un tamaño aproximado de 1300 pb que correspondía al cDNA del gen *pgx1* de FORL. La comparación de la secuencia genómica con la del cDNA obtenida se indicaba la presencia de 5 intrones cuyas longitudes oscilaban entre 45 y 59 pb. La secuencia completa del clon analizado (GenBank AF395107) así como, la secuencia de aminoácidos deducida utilizando el programa EditSeq (Lasergene, USA) se representa en la figura 1.3b.

La secuencia de aminoácidos deducida forma una proteína de 455 aminoácidos, con una masa molecular teórico de 50 kDa y un punto isoeléctrico de 5,97 (Tabla 1.1). Se dedujo la presencia de un péptido señal de 24 aminoácidos mediante la utilización del programa SignalP V1.1 (Nielsen, *et al.*, 1997) y el lugar de corte de la proteasa KEX (Julius, *et al.*, 1984) entre las posiciones ³²Arg y ³³Pro. Se observó por medio del programa NetNGlyc 1.0 (Gupta, *et al.*, 1999) la presencia de 10 posibles sitios de glicosilación en las posiciones 135, 174, 210, 264, 276, 303, 308, 340, 365 y 375.

aattctctcatgcaatcaagttctcgaccgtgtgtgacaattggttggagaac	-578
atcaaaaacctcttgtcagtcacatcatgaacttcggtgtaagatggtgaagtgg	-524
gggtatTTTTtagcatcctcctcaagggagttgagatgaggaacaagcctgactg	-470
tagacctagacatgatttgagcaagcagggccttgacatactactcaatgtcatg	-416
cccgtaacatccgattcaaccgagaagacgttaacatttggctgcaagctggca	-362
atccagctcattcaaccttggggtagtttggggggttgggggatctccggaaa	-308
tgaaccagtagcaaggggaaactcaaaatcatggtaaatgatgttcattggccaa	-254
tttgcggagaaagcgatattgaatcctaccccgcaatttaagtaaatggcatcg	-200
tggggtaaagcgtgggttggaaacgatagcgtcggctgtggatctcacct	-146
gaactttagccagaatatcagacatagttgtccaccaatagcaatgtctacta	-92
tgaaagatatccaaaggtctggtataatataaaagacgtgagtttggcgttgaca	-38
atatgtttcgctatcagcagctcattcgagaatcaacATGTTGTTCAATAACGT	17
	<u>M L F N N V</u>
	6
TCTTTCGGCGGTCGCCGTGTCTGTTCTTGTGTGTCGTCAGTTGTTGGCACCTCGTC	71
<u>L S A V A V S V L V S S V V G T S S</u>	24
TCGCAACTCGGCGTTACCCAAGAGGCCCCATGTTGAGGCTGCACCCTATGGTAC	125
<u>R N S A L P K R P H V E A A P Y G T</u>	42
AGGCAAAGCCTTTTCTGCCTCTCCCGCGGATCTCGCAAGGACTTCTGTTATGT	179
G K A F P A S P A R S R K D F C Y V	60
CAACCCTGGCAAGGGTAAGAATGTCGACGATGCTCCTAGCATTTTGAAAGCATT	233
N P G K G K N V D D A P S I L K A F	78
CAAGAAGTGCAACAAAGGAGGCACAAATTGTTCTTGATCAGAAGTACAGCATTGC	287
K K C C N K G G T I V L D Q K Y S I A	96
CTCGCCACTCGACTTGACCTGGCTCGCTCATGTGATGTTATCATTACTGGAGA	341
S P L D L T W L A H V D V I I T G E	114

GGTCAACTTCAAATCCGACCATACTACTGGGCAGACCACAGCTTCAAATATGA	395
V N F K S D P Y Y W A D H S F K Y D	132
CTTCCAGAACATGTCTCTGTTCTGGAAGATCGGCGCAAGGACATCCATATTTA	449
F Q <u>N M S</u> S F W K I G G K D I H I Y	150
TGGCGATCTGACAAAGGGGGAGTCTCTGCTTGATGGTCATGGGCAAGCTTACTG	503
G D L T K G E S L L D G H G Q A Y W	168
GGAAGAGATGGCTGTCAACAAGACTgtaagtcgtgatataatcccagcactactc	557
E E M A V <u>N K T</u>	176
CgtttccagtcgataactaattgtcataaagT TACTGAGACCAATTCTGTTGACA	611
L L R P I L L T	184
ATTGAAGACGCCCATGGTCTCACCATGTCAAACCTGCGAATGAGAAACCCGCC	665
I E D A H G L T M S N L R M R N P P	202
AATgtaagtcctcagttacatcaagcatagtcctctactcactcatgaatcagTGGT	719
N W F	205
TCAACATTATCATCAACAGCACGGACGTGTTGATCAGTGATTTAGAGCTTGAAG	773
N I I I <u>N S T</u> D V L I S D L E L E A	223
CCAAGAGCTTGAATGGTGTCAAAAATCGCCAACCTCTGATGGTTGGGATACATAAC	827
K S L N G V K I A N S D G W D T Y R	241
GTTCCGACCGCATTGTTATCCAAAATCCGTTATTGACAATACCGACGgtaagt	881
S D R I V I Q N S V I D N T D D	257
GgccacttgaccaggttctattcaccttcttacaacagtagATTGTGTGTCTTT	935
C V S F	261
CAAGCCAAATAGTACAAAACGTGGTTGTTTCAGAACCTCGTGTGCAATGGCTCTCA	989
K P <u>N S T</u> N V V V Q N L V C <u>N G S</u> H	279
CGGCATCAGTGTGGCTCCCTGGGCCAGTATAAGGGTGAAACCGACATCGTGGA	1043
G I S V G S L G Q Y K G E T D I V E	297
GAATCTTTACATCTACAACATTTCCATGTCCAACGCCAGCGATGGTGCCTCGAAT	1097
N L Y I Y <u>N I S M S N A S</u> D G A R I	315
CAAGGTGTGGCTGTTGTTGAGACTGCCTTCCAGAGTCTGTTGAACGGCGGCGG	1151
K V V P G V E T A F Q S L L N G G G	333
TGGTCTCGGCCGTGTCAGAAACGTGACATACGATACGTTCTACCACGAGAATAA	1205
G L G R V R <u>N V T</u> Y D T F Y H E N N	351
CGATAACGCTATTACCATTACTCAGTGTATGGCCAGAAGAACCAGACTCTGTG	1259
D N A I T I T Q C Y G Q K <u>N Q T</u> L C	369
CAACGAGTTTCCAgtaagtttgactaacataaatgaactacctgtcactgacaa	1313
N E F P	373
ttaataaccagGCAAACCTTGACTATTGAGGACGTCACGATGAAGAACTTCTGGGG	1367
A <u>N L T</u> I E D V T M K N F W G	388
AACAGTTTCAACGAAATACGACCCACGAGCTGGATCTCTTGTGTTGTCAGTGCACC	1421
T V S T K Y D P R A G S L V C S A P	406
CGATgtaagcacacaatgccaaatacacagtgagggtgactgacatcattacag	1475
D	407
CGTTGCAGTAACATCGTGGCTGAGGATATTAAAGTCCAGGTTCCAAGCAAGAAG	1529
R C S N I V A E D I K V Q V P S K K	425
CCACCGGTCTACGACTGTCAGAACATCGACACGAGCACCTTGGATATTACATGC	1583
P P V Y D C Q N I D T S T L D I T C	443
CGAGACCCAACCAATGCCAGGGACACAACCAATGGATAGgaacatcaggctgat	1637
R D P T N A R D T T N G Stop	455
cgacctatagtaattcaagatccggtga	1665

Figura 1.3b: Secuencia de nucleótidos del gen *pgx1* de FORL y secuencia de aminoácidos deducida con el programa EditSeq (DNASTar, USA). Las regiones no codificadoras están en minúsculas, las teóricas cajas CAAT se señalan en rojo, TATA en rosa y la secuencia que rodea al codón de inicio ATG en azul. Los aminoácidos que forman el péptido señal están subrayados con doble línea y los que van hasta la zona de corte de KEX con línea sencilla. Los supuestos lugares de glicosilación están en negrita y subrayados. En los intrones las secuencias implicadas en su procesamiento están en negrita. En verde se señala la hipotética secuencia de poliadenilación.

Caracterización del gen *pg1*.

Se realizó el escrutinio de la genoteca genómica de FORL con la sonda correspondiente al gen *pg1*. Tras finalizar el escrutinio y el proceso de subclonaje se obtuvo un fragmento de 3365 pb que presentaba un marco abierto de lectura de 1319 pb y unas regiones aguas arriba de 1538 pb y aguas abajo de 508 pb. La secuencia de aminoácidos se comparó con secuencias de ENDOPGs del género *Fusarium* presentes en el banco de datos GenBank mediante el programa MegAlign (Lasergene, USA) y se observó un porcentaje de similitud del 99.5% con la ENDOPG1 descrita en FOL (Arie, *et al.*, 1998). Comparando ambas secuencias por medio de un alineamiento realizado con el programa MegAlign (Lasergene, USA) se determinaron el número y la posición de los intrones. Se observó la presencia de 4 intrones de longitudes que oscilan entre 47 y 50 pb. La secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína PG1 así como las regiones adyacentes no codificadoras 5' y 3' (GenBank AY485190) y la secuencia de aminoácidos deducida se muestra en la figura 1.3c.

La secuencia de aminoácidos deducida mediante el programa EditSeq (Lasergene, USA) forma una proteína de 371 aminoácidos con una masa molecular y un punto isoeléctrico teóricos de 38,5 kDa y 6,65, respectivamente (Tabla 1.1). La presencia de un péptido señal de 16 aminoácidos, se determinó mediante la utilización del programa SignalP V1.1 (Nielsen, *et al.*, 1997). El lugar de corte de la proteasa KEX se sitúa entre las posiciones ²²Arg y ²³Asp. Se observó por medio del programa NetNGlyc 1.0 (Gupta, *et al.*, 1999) la presencia de 2 posibles sitios de glicosilación en las posiciones 278 y 283.

```

gctgcagaaatgtattcgattatggcattgctaacattgcttggatgaagatgtg -1485
agctgagggcataggattgcaagcatgggagccaaccagggatcgttatgttact -1431
tcaggatagctctctggttcttggagatgttaaaaagacgacatgcctttctga -1377
caatcggttttcgctctcgacgagatattgttattgtaaaactcagtgttcta -1323
caatgaaacccaaaccatgtgtatctctatggttcgagcttgggaaaacttcgc -1269
ctagtcaagaatcgggttcttctgtgtccatgtcttcgaccgtgagaaattgagg -1215
cttctcagtggttacgtggaatcgacaaggatgaatgtgaaaccaacatgtg -1161
gtattaagatcggaatagagttgccggtcatgaccttgcacttttacaggcata -1107
gagggggaaaagcaatctgattagcggatcttattacccccgtaccccgcaaattt -1053
gtccccatgggcaattgtgaaagttaaatccatataaggagcccccaatccgcg -999
atctgccagacgaacctggaatagcttctaggtggtcgggctaactgtgacacta -945

```

Capítulo 1: Caracterización de genes codificadores de PGs en FORL.

tctccgggtccgtaagacagatctcgactaagcttgagtgaaattatggatgata	-891
gagtttggggaagtctgggtattattgggggtggcttatccgtcttttacttg	-837
gtcttttccgccagaggagagttcattcgaatcggtatcgtgcacgcagagaga	-783
ggattgtgggttttttaggcgactggcagctcaaagttcagatgaatgagattg	-729
agaaagg caatcaat taagggataaataacggaccctacagggactctaggaga	-675
ttggttccatgtttcaagtttcatgatagctgagagttagccggactcggata	-621
aaaggtaccgaagcgacgaatcccagaaaccagcttgagccagaacggcaacat	-567
agcagacatagacagagtgatctcagaaacactcactaatgcatcgaatcattc	-513
cgagaaacacgagtcacttacagcaaatttcagggtagggatggctcctcgc	-459
taaacttggcgaaacactttaaccatttggg caat tccctgcattatcccacg	-405
aatcaca caat agcgcaccgaccttcaagtgccgaactgccgagaagtcggtga	-351
acgaccatgcctgtaaataatttccgacgtggagaaaattccattatagcgcgac	-297
tcgcaggttttgagcgtgccgatagccagagtgccgataccgatttagacatg	-243
ctgagtagcgggttaggggttctaagatgaatgggaatgactatcctctg	-189
gaacgacgagacggaatttgaatattcctt caat gggatctgggagtagcattg	-135
cagttgaatagaatagatgatgatc tataaa acatcatcttgtgccacttcag	-81
aaagagtctgaattgattcatcgc caag cacttcaacaacccttgcacctct	-27
tgtctttgtctcactcgaat atcaca ATGGTTCGAAACATCGCTATTGCGGCTT	28
<u>M V R N I A I A A L</u>	10
TGCTGCCAGCTGCCTTTGCTTCAACGCTGCCTgtaggacaaccaactcgttcca	82
<u>L P A A F A S T L P</u>	20
agctcacaccact aa caaat tcag AAGCGAGACCCTTGCGGTCACCTGACTA	136
<u>K R D P C S V T D Y</u>	30
CTCCGGCCTCGCTACCGCCGTCTCATCTTGCACAAACATTGTGCTCAACGGTTT	190
S G L A T A V S S C T N I V L N G F	48
CCAAGTCCCCTGGAAGGCTCTTGATCTATCCAAGCTCAAGGACGGCGCAAC	244
Q V P T G K A L D L S K L K D G A T	66
CGTTACCTTCAAGGGCAAGACC gtaagt tacttttctccgtgtatctgaggagtg	298
V T F K G K T	73
ctaa agctgaacgtgat ag ACGTTTGCCACTACTGCCGATAACGACTTTGATCC	352
<u>T F A T T A D N D F D P</u>	85
TATCGTCATTAGCGGAAAATGGCATCACTATAACTGGTGCATCTGGCCATGTCAT	406
I V I S G N G I T I T G A S G H V I	103
TGATGGTAACGGCCCGGCTACTGGGATGGCGAAGTTCTAACAACAAGGACAA	460
D G N G P A Y W D G E G S N N K D N	121
CCCAA gtatttt ccccacgacctgttgcaacagaggatata ctgac cttaaa	514
P K	123
ag CCCCGACCATTTTCATCGTTGTCAAGAAGACTACTGGCAACTCAAAGATCACA	568
P D H F I V V K K T T G N S K I T	140
AACCTAAACATCCAGAATTGGCCTGTTCACTGCTTCGACATCACAGGCAGTTCA	622
N L N I Q N W P V H C F D I T G S S	158
CAATTGACCATCTCAGGGCTCATTCTTGATAACAGACTTAGCGACAAGCCCAAT	676
Q L T I S G L I L D N R L S D K P N	176
GCCAAGAGCGGTAGTTTGCCCGCTGCGCACAACAGCGACGGTTTCGACATCTCG	730
A K S G S L P A A H N S D G F D I S	194
TCCAGTGACCAGTTACTCTAGATAACATTCATGTTTATAACCAGGATGACTGT	784
S S D H V T L D N I H V Y N Q D D C	212
GTTGCTGTCACTTCGGGTACAAACATCATCTCTCCAACATGTACTGCTCCGGT	838
V A V T S G T N I I V S N M Y C S G	230
GGTCATGGTCTTAGCATCGGATCTGTCGGTGGCAAGAGCAACAATGTCGTCAT	892
G H G L S I G S V G G K S N N V V N	248
GGTGTTCAGTTCTTGATTCGCAGATTGTTAACAGTGAGAATGGATGCCGCATC	946
G V Q F L D S Q I V N S E N G C R I	266
AAGTCCAACCTCTGGCACAACCTGGCACG gtaagc aaacaccaaccatcacgtg	1000
K S N S G T T G T	275
cattctcaggaa ctaact gtgttat tag ATTGCGAACGTCACCTACCAAAACAT	1054
<u>I A N V T Y Q N I</u>	284
TTCCCTTACCAACATCTGCAAGTATGGTGTTCGATGTCCAGCAGGACTATCTCAA	1108
<u>S</u> L T N I C K Y G V D V Q Q D Y L N	302
CGCGGCCCTACTGGAAAAGCCGACCAACGGAGTCAAGATCAGCGGCATCAAGTT	1162

G G P T G K P T N G V K I S G I K F	320
CATCAAGGTCACTGGTACAGTGGCTAGCTCTGCTCAAGATTGGTATATTCTGTG	1216
I K V T G T V A S S A Q D W Y I L C	338
TGGCGATGGTAGTTGCTCTGGATTCACTTTCTCTGGAAACGCCATCACTGGTGG	1270
G D G S C S G F T F S G N A I T G G	356
TGGCAAGACTAGCAGCTGCAACTATCCTACCAACACTTGCCCTAGCTAAgtcta	1324
G K T S S C N Y P T N T C P S stop	371
agcgggacgatcatcactccctggtcactaagcttgaactcagtcaaagagtgg	1378
tcttacggttggtgctggaattgctgcgggcgggcagttgtgagcttgggtcta	1432
tagtagtggttgcgatagtcactaggcttatcttagcaatacactttattta	1486
tcgcagcagtcacatatcaagtaactatcttagtaataacgccaactccgacattt	1540
tgtagtataagaatgagtggttctgctgcttgactagttgcagtcaccagtgcaa	1594
aagtgtaattgtaagacaggtagcatgggtactgggtgcaaacatatggctaaa	1648
aggcctagtggttgcctgctcgcaggtgatggcttgcctcctggcagtgcaa	1702
caaggtcatcaatccggttaaacgcaagtaactacatagacctaacgactttgca	1756
actgttttttaggatgtgaccaagttcgatcccagcgtccttgagtataacaga	1810
gccgacagccaacttct	1827

Figura 1.3c: Secuencia de nucleótidos del gen *pg1* de FORL y secuencia de aminoácidos deducida con el programa EditSeq (DNAS_{tar}, USA). Las regiones no codificadoras están en minúsculas, las teóricas cajas CAAT se señalan en rojo, TATA en rosa y la secuencia que rodea al codon de inicio ATG en azul. En naranja se señala la hipotética secuencia de comienzo de la transcripción. Los aminoácidos que forman el péptido señal están subrayadas con doble línea y los que van hasta la zona de corte de KEX con línea sencilla. Los supuestos lugares de glicosilación están en negrita y subrayados. En los intrones las secuencias implicadas en su procesamiento están en negrita. En naranja se señala la hipotética secuencia de comienzo de la transcripción. En verde se señala la hipotética secuencia de poliadenilación.

Caracterización del gen *pg2*.

Se realizó el escrutinio de la genoteca genómica de FORL con la sonda correspondiente al gen *pg2* hasta obtener un clon genómico denominado λ_{pg2} cuyo DNA fue digerido con diversas combinaciones de enzimas para obtener un fragmento que pudiera ser subclonado en un vector bacteriano. El fragmento *Xho* I/*Eco*R I del clon genómico λ_{pg2} fue secuenciado obteniéndose una secuencia de 3462 pb donde se observó la presencia del comienzo de un marco abierto de lectura de 1113 pb y una región aguas arriba de 2352 pb. La secuencia codificadora completa obtenida fue comparada mediante el programa BLASTX (Altschul, *et al.*, 1997) presente en el GenBank, con la secuencia del gen *pg5* de FOL (Genbank AF078156) mostrando una identidad del 86%. En la secuencia obtenida se observó la presencia de una diana *Eco*R I no encontrándose la totalidad de la secuencia codificadora de la proteína PG2, por lo que se recurrió a la técnica RT-PCR para obtener la parte final de la secuencia codificadora (entre la posición +1107 y la +1131). La secuencia

completa obtenida presentaba un marco de lectura abierto 1131 pb y unas regiones no codificadoras adyacentes de 2349 pb aguas arriba y 150 pb aguas abajo. La secuencia de nucleótidos obtenida así como la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la figura 1.3d (GenBank AY485189).

La proteína codificada a partir de dicha secuencia estaría formada por 360 aminoácidos y presentaría un peso molecular de 37,2 KDa y un punto isoeléctrico 8,34 (Tabla 1.1). Se determinó la presencia de un péptido señal de 17 aminoácidos usando del programa SignalP V1.1 (Nielsen, *et al.*, 1997). Se observó por medio del programa NetNGlyc 1.0 (Gupta, *et al.*, 1999) la presencia de 5 posibles sitios de glicosilación en las posiciones 211, 218, 245,293, 334.

```

gatcagatacacctgcaactggctggtaggggccga -2316
cggcgctgggtcagccgtccgcagactctccgacatcacatttgacggcttctc -2262
ttggcccaaggaagacttcgtcgcacaaccaacgtacgctttgatttcatgaagca -2208
tgggttttcgaccgccaactttatcatggaccctgtgcaactggcctcgtatg -2154
cattctagacgacgctggcctttggcgttgtgcctttgggtgtaaggcgggaat -2100
gacaaacgatgagattcgggcccagatcgatgagcactacaagcacatctttcc -2046
agtctggcccgtcgaatacagagctcgtggagctaaacaagtaacaagccgatca -1992
gagatgtgcctcgacatttaggaaaggaagagttttgcctggcgggagatgcagc -1938
tcatgtgcgctgattctcagagacccttgaaccatattccgcgagatcatc -1884
tgaagtactgactcataacctgtagagcccaaccctattggaggactaggcttg -1830
actacaggcctcttggacgcgggaccctcggctcgcgctcttgggtgcccgtgata -1776
aacggctcgagcaccagaaggcctccttgactactgggcaaatgcgcgctcgcggc -1722
aagtggctcactttcacgaatgccttctccattgagaataagagaatgatccag -1668
atggccggatacagtgaagaccctcttgggtatatgggcccgatgacgaagtgc -1614
aaagaacataacatggagaagtgggtaaggacggcaactccgggaaagaaacag -1560
gaggacactcagttctatgagtcgctcgcagaccttcataaccaggatagttc -1506
catgtgaggcaatggagcattactcttgatcctcgggtggatggaggaatacag -1452
gatccagaggtcgtaaaagtacagaatttccttcggccagatagactttaagt -1398
tacgtatactgggtcccactctggacaccaatcggggcctgcgcgactcggagtca -1344
ccggaattaggttacgagcttctaaatactggcaaagtgaaagttagctctcata -1290
taacaaggatccgccttttcttctctgagtaatgcggagtgcgacgaacaaca -1236
ctaatacagtgattcttatgatcatttgaaggacgagattgcctttgaatatac -1182
aaagatgcgtgctacagtgaggtagaaaaggaatcagaatgaggtcgtctgca -1128
tggcggcatggttggctcctatgaaaacttgtaatggctttgcagagtatgggtt -1074
aatgggatgcaagctcaccacaacacttgatacctattgattggtgtctcccag -1020
tacttggaaacttactcctgggacacatttttcgggttccgaccagactcctc -966
tccaattgggggccccttatcagcttgggttctcactggtgatggcatagaatt -912
tgtctcattaccggccacataactcctctggacgataaaaaatgagacaaatgg -858
gctctgagaagttcgagacgcttgcttccccattcaaatcgccatgccccca -804
tcacactatggtgatatacggagctagagggaaaagataatctgtgcaacatt -750
tagtggttagacttaaggaggtaaaaatcaacgttaacttagtaaagtcaaatt -696
ctaaacagaatagagttcgcggttccggtgctaataagtaggttagtgtagct -642
cgtaaagaccacataatctggggaaaatacaccacgaatgaaaagaatcaccga -588
cgtgccttattggcgaaaagcttcgggggaagctatattggctagtgccaattgg -534
ggacacgcgaacgtgcagcagctttacttatttaaaaatcgtttgagaaacagtt -480
ggaatgcggtcaatgtgcccgggcatccgagatggtccagattcccagactcgat -426
ggtgaaacatgacagcctgacaggtgctctggaaaaatgcagtccaccaattga -372
ctaagcttcttgtggcgtcgaggttggcgttcaatcttaaccccggtagattg -318

```

ggggctatgtggagcatcaatctaattcccgaacctcccaaaaccaaactcgcg	-264
atccctaatacaagatgcaggccgatggtgttgtaaacacgggccactatcacg	-210
gctgaacggcatctatgcgcgacatctcatgattcgagcttcaaatgcbgct	-156
tcagatataggagtgcaacttagtatataagagacccgatgctcttgccattg	-102
tctatcttggttcttgccatcagcattccattcaacagtataacttcaatctcgat	-48
atacactttctctaaacttccattcttttaa	7
caatccattc	3
attaac	3
ATGTTCT	3
CTTCAACTGTCCTTCTCAGCGGCCTGGTCGCCTCCGTACTTGCGGCCCCAGCTC	61
<u>S T V L L S G L V A S V L A</u> A P A L	21
TTGAGCCTCGTGCCGGCAGCTGCACCTTTCACCGATGCTGCTACTGCTATTAAGA	115
E P R A G S C T F T D A A T A I K N	39
ACAAGGCTGGCTGCTACTATCACCTCAACAACATTGCCGTTCTGCCAAGA	169
K A G C S T I T L N N I A V P A K T	57
CCACTCTCGACTTGACCAAGCTCAATGATGGCACTCACgtgagctaactcatat	223
T L D L T K L N D G T H	69
Ctctatccatgcaaatctaacaaaacttg	277
cagGTCATCTTCCAGGGCAAGACCA	77
V I F Q G K T T	77
CTTTTCGGCTATGCTGAGTGGGAGGCCCTCTCATCTCCTTCACTGGTAACAATC	331
F G Y A E W E G P L I S F T G N N L	95
TTCTCATCGAGGGAGCTGCTGGACACTCCATCGACTGCGAGGGTAAGAGATGGT	385
L I E G A A G H S I D C E G K R W W	113
GGGACGGCAAGGGCAGCAACGGCGGCAAGAAGAAGCCCAAGTTCTTTCAGCGCCC	439
D G K G S N G G K K K P K F F S A H	131
ACTCTCTCAAGAACTCCAACATCAAGAACTTGAACGTTCTCAACACCCCTGTCC	493
S L K N S N I K N L N V L N T P V Q	149
AGGCCTTTCAGCATCAACAGCGTCAACAACTTGGGCGTCTATGGCGTTCACATGG	547
A F S I N S V T N L G V Y G V H M D	167
ACAACCTCTCGGCGACTCTCTCGGCGGACACAACACCGATGCTTTTCGACGTTG	601
N S L G D S L G H N T D A F D V G	185
GCTCCTCTAACGGCGTGTATATCTCTGGAGCTGTTGTCAAGAACCAGGACGATT	655
S S N G V Y I S G A V V K N Q D D C	203
GTCTCGCCATCAACTCTGGTACCAACATCACCTTTCACCGCGGCAACTGCAGTG	709
L A I N S G T N I T F T G G N C S G	221
GCGGCCACGGTCTCTCCATTGGATCCGTTGGTGGACGCTCTGACAACACCGTCA	763
G H G L S I G S V G G R S D N T V K	239
AGACTGTCCGCATCCTCAACTCTTCCATCTCCAACCTCCGACAACGGTGTCCGCA	817
T V R I L N S S I S N S D N G V R I	257
TCAAGACCGTTTCTGGCGCTACCGGTTCCGTTTCCGATGTCAAGTACGACACCA	871
K T V S G A T G S V S D V K Y D T I	275
TCACTCTCTCCAACATCGCCAAGTACGGTATCGTCATTGAGCAGGATTACGAGA	925
T L S N I A K Y G I V I E Q D Y E N	293
ACGGTCTCTACTGGAACCCCCACTGCTGGTGTCCCCATCACCGACGTCACCA	979
G S P T G T P T A G V P I T D V T I	311
TCAACAAGGTCACCGGAACTGTCAAGTCCAGCGGAACTGATGTCTACATCCTTT	1033
N K V T G T V K S S G T D V Y I L C	329
GCGCCAACGCAAGAAGTGGACCTGGACCAACAAGGTCACCTGGTGGAAAGA	1087
A N C K N W T W T N N K V T G G K T	347
CCTCTACCAAGTGCAAGGAATTCCTCTGGTGCCTCTTGCTAAgtggttgagtc	1141
S T K C K G I P S G A S C stop	360
tgggtgaggagaagtagacatggaggttgtgtagaacatgacatatagctggtact	1195
atcttctattggtttgttttctttgtacatatatgctatcagttaataactattgt	1249
ccctgatacccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1283

Figura 1.3d: Secuencia de nucleótidos del gen *pg2* de FORL y secuencia de aminoácidos deducida con el programa EditSeq (DNASTar, USA). Las regiones no codificadoras están en minúsculas, las teóricas cajas CAAT se señalan en rojo, TATA en rosa y la secuencia que rodea al codon de inicio ATG en azul. Los aminoácidos que forman el péptido señal están subrayadas con doble línea. Los supuestos lugares de glicosilación están en negrita y subrayados. En los intrones las secuencias implicadas en su procesamiento están en negrita. La secuencia obtenida secuenciando el cDNA obtenido mediante RT-PCR esta subrayada con puntos.

	Con péptido señal			Proteína madura		
	pI	aminoácidos	kDa	aminoácidos	kDa	pI
<i>pgx1</i>	5,97	455	50	423	46,7	5,44
<i>pgx2</i>	8,27	464	51,7	418	46,6	8,171
<i>pg1</i>	6,65	371	38,5	349	36,2	5,95
<i>pg2</i>	8,34	360	37,2	343	35,5	8,345

Tabla 1.1: Análisis comparativo de las cuatro PGs de FORL.

Análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos de las cuatro PGs de FORL.

La longitud de los cuatro genes, así como, el tamaño, el número y la posición de los intrones se muestra en la figura 1.4. Se puede observar que los dos genes codificadores de EXOPGs son de mayor tamaño que los genes de ENDOPG.

Dentro de las secuencias correspondientes a las regiones no codificadoras situadas aguas arriba de los cuatro genes, se ha podido detectar la caja TATA (posiciones -82 en la secuencia *pgx2*, -64 en *pgx1*, -109 en *pg1* y -130 en *pg2* antes de la posición +1 el codon ATG). Se observó la presencia de varias hipotéticas cajas CAAT en las secuencias aguas arriba de cada uno de los genes descritos (Figura 1.3a, 1.3b, 1.3c y 1.3d). Alrededor del codon de inicio, que en los cuatro casos es ATG, se ha descrito una secuencia consenso CCACCATG para eucariotas superiores estando la A de la posición -3 un 80% de las veces (Kozak, 1986), pero en el caso de los genes de PG esta secuencia consenso no está presente. Sin embargo, se puede observar en los cuatro genes (Figura 1.3) la presencia de una secuencia alrededor del codon de inicio similar a la descrita en *Neurospora crassa* ATCAC(C/A) (Legerton y Yanofsky, 1985). En el extremo 3', la secuencia consenso AATAAA implicada en la poliadenilación del mRNA, no está presente en las regiones 3' no codificadoras obtenidas, aunque sí está presente en los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* la secuencia TAGT idéntica a la secuencias de poliadenilacion descritas en levaduras (Zaret y Sherman, 1982).

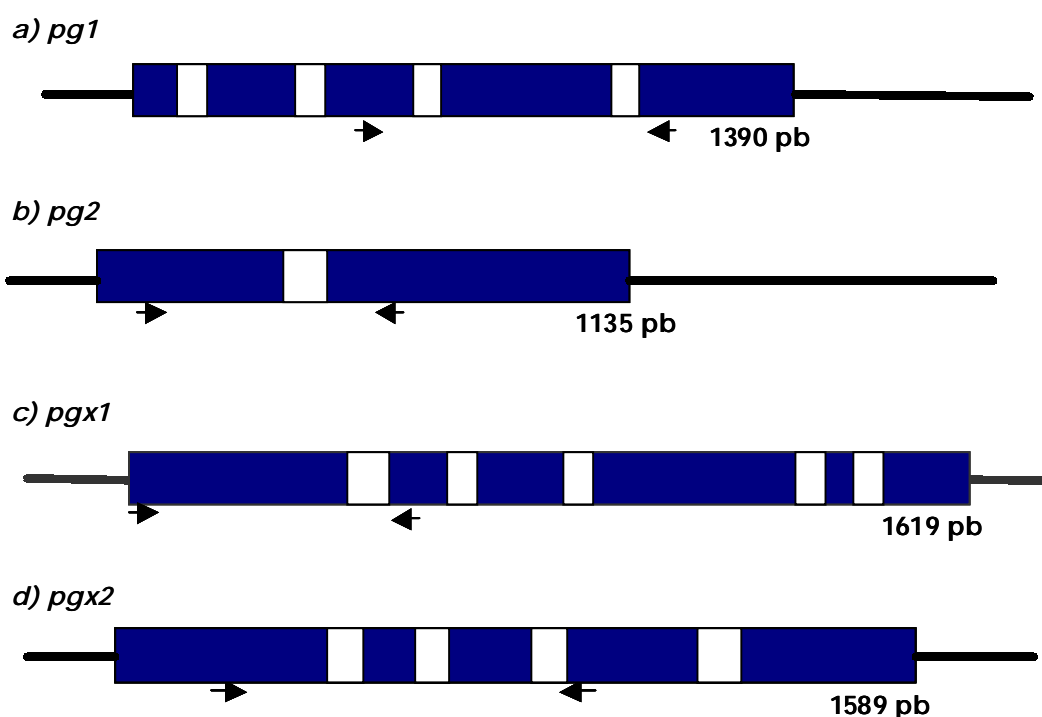


Figura 1.4: Representación esquemática de las regiones codificadoras de los cuatro genes de PGs de FORL. En blanco se representan los intrones y señalados con flechas las regiones que han sido utilizadas como sondas.

El tamaño entre 45-59 pb y el número de los intrones (entre 1 y 5) se ajusta a lo descrito para los genes de hongos filamentosos, donde los intrones suelen tener menos de 100 pb (Gurr, *et al.*, 1987). En todos los intrones las secuencias de escisión del extremo 5' se ajustan exactamente a la descrita para hongos filamentosos, GTPuNGPy (Gurr, *et al.*, 1987) excepto el intrón 3 del gen *pg1*, que presenta una T en lugar de la G presente en la posición tercera de la secuencia consenso, y los intrones 1 del gen *pg1* y 2 y 3 del gen *pgx2* que en lugar de la pirimidina de la posición sexta presentan purinas. En el extremo 3' la secuencia consenso descrita PyAG para hongos filamentosos (Gurr, *et al.*, 1987) se ajusta a las presentes en todos los intrones excepto en el intrón 3 del gen *pg1* y el intrón 1 del gen *pgx1* en el que la pirimidina se sustituye por una A (Tabla 1.2). La secuencia consenso interna y necesaria para la formación del *lariat* descrita en levaduras es TACTAAC (Gurr, *et al.*, 1987) pero son pocos los intrones que la presentaban exactamente. La mayoría sólo conservan el par CT en la posición 4 y 5 y la A en la posición 6 de

una secuencia consenso bastante flexible CTPuAPy (Unkles, 1992). Estas tres posiciones están conservadas en todos los intrones, pero no siempre se puede observar la presencia de la secuencia consenso completa CTPuAPy (Tabla 1.2).

<i>pgx1</i>					<i>pgx2</i>				
	5' GTPuNGPy	3'PyAG	NNCTPuAPy	tipo	5'	GTPPuNGPy	3'PyAG	NNCTPuAPy	tipo
intrón 1	gtaagt	aag	ctaat	0		gtatgt	tag	ctaat	0
intrón 2	gtaagt	cag	ctcac	0		gtatga	cag	ctaac	1
intrón 3	gtaagt	tag	cttac	1		gtaagg	tag	ctgat	1
intrón 4	gtaagt	cag	ctgac	0		gtaagc	tag	ctaat	1
intrón 5	gtaagc	cag	ctgac	0					

<i>pg1</i>					<i>pg2</i>				
	5' GTPPuNGPy	3'PyAG	NNCTPuAPy	tipo	5'	GTPPuNGPy	3'PyAG	NNCTPuAPy	tipo
intrón 1	gtagga	cag	ctaac	0		gtgagc	cag	ctaac	0
intrón 2	gtaagt	tag	ctaaa	0					
intrón 3	gtattt	aag	ctgac	2					
intrón 4	gtaagc	tag	ctaac	0					

Tabla 1.2: Tipo de intrones y secuencias consenso implicadas en el procesamiento de las cuatro PGs de FORL.

La fase del intrón 1 es igual en los cuatro genes, estando éste situado entre dos codones (fase 0). Lo mismo ocurre en los intrones 2 y 4 de los genes *pgx1* y *pg1* variando únicamente la fase del intrón 3, que está en fase 1 en *pgx1* y en fase 2 en *pg1*. Los intrones 2, 3 y 4 del gen *pgx2* se encuentran todos en fase 1 estando situados entre el primer y segundo nucleótido de un codón (Patthy, 1987). El intrón 5 únicamente presente en el gen *pgx1* también se encuentra en fase 0 (Tabla 1.2).

% G+C	aguas arriba	codificadora	intrones	aguas abajo
<i>pgx1</i>	44,29	49,05	40,08	42,86
<i>pgx2</i>	46,55	51,25	39,06	39,41
<i>pg1</i>	45,44	50	43,78	45,17
<i>pg2</i>	47,87	54,76	37,5	35,9

Tabla 1.3: Contenido en G+C de las regiones aguas arriba, aguas abajo, codificadoras e intrones de los 4 genes de PGs de FORL.

Mediante el programa EditSeq (Lasergene, USA) se ha calculado el porcentaje de G+C de las regiones aguas arriba, aguas abajo, codificadoras y correspondientes a los intrones de los cuatro genes de PGs caracterizados. Se puede observar (Tabla 1.3) que las regiones codificadoras presentan un mayor contenido en G+C.

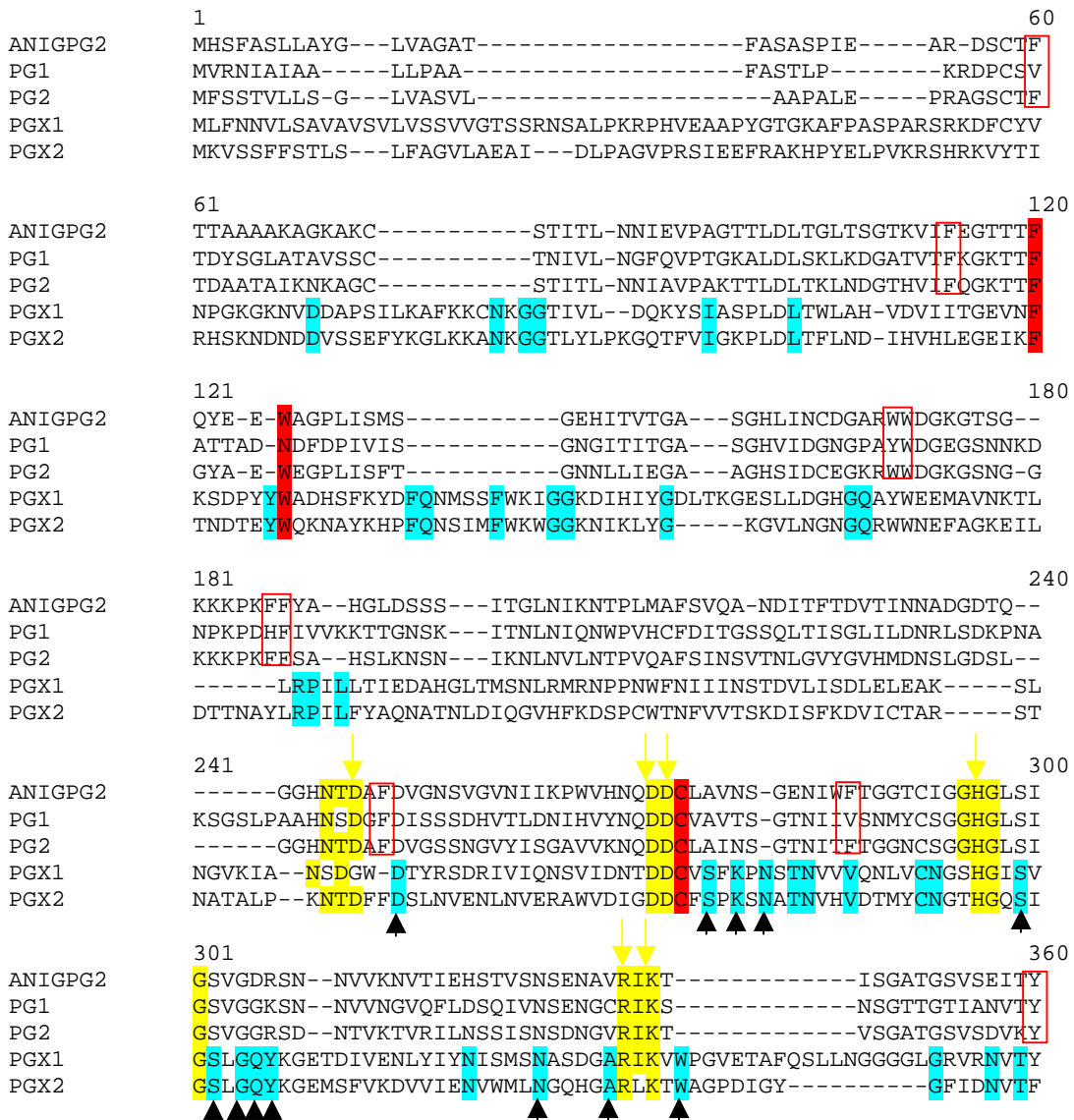
Comparación de las secuencias de aminoácidos de las cuatro poligalacturonas de FORL.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro PGs descritas en FORL y la PG2 de *A. niger* la cual se introdujo como referencia para identificar los residuos conservados, con el programa MegAlign (Lasergene, USA) se muestra en la Figura 1.5. El porcentaje de similitud obtenido mediante el método CLUSTAL (PAM250), utilizado por el programa MegAlign, entre las cuatro secuencias de FORL oscila entre el 12,1% obtenido entre la PG1 y la PGX2 y el 40,2% entre las dos secuencias de ENDOPGs. La similitud entre las dos secuencias de EXOPGs fue del 28,3%.

En la Figura 1.5 se observa, señalados en amarillo, la presencia de motivos característicos de PGs, en las cuatro PGs de FORL: los motivos Gly-His-Gly (222) (Caprari, *et al.*, 1993b) y Arg-Ile-Lys (256) Asn-X-Asp (178) y Asp-Asp (201) (Kitamoto, *et al.*, 1993;Reymond, *et al.*, 1994), así como los residuos Gly (228) y Tyr (355) (Stratilova, *et al.*, 1998) (la numeración de los motivos corresponde a la posición que ocupan en la secuencia de *A. niger* PG2). En todas las EXOPGs descritas la Gly 222 ha sido sustituida por una Ser excepto en las secuencias correspondientes a PGX2 que es sustituida por una Thr, asimismo, la Ile 257 de la PG2 de *A. niger* es sustituida en PGX2 por Leu. También se han señalado en rojo los motivos conservados únicamente en las PGs de origen fúngico.

Con el fin de observar cuales eran los residuos conservados en todas las EXOPGs, se realizó un alineamiento mediante el programa MegAlign (Lasergene, USA) de las dos EXOPGs de FORL con todas las EXOPGs

presentes en el Genbank hasta la fecha: PGX4 de FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000), PGAX de *Aspergillus tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996), PGX1 de *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998), PGX de *Botryotinia fuckeliana* (Genbank AF145229) y la EXOPG descrita en *A. nidulans* (GenBank AY237304). Este alineamiento nos permitió detectar todos los residuos conservados comunes a las EXOPGs, para posteriormente identificarlos en las EXOPGs de FORL. Estos residuos se señalan en la secuencia de PGX1 y PGX2 en la figura 1.5 en azul. Por otro lado, también se indican recuadrados en rojo los motivos característicos para las ENDOPGs de hongos propuestos por Markovic y Janacek (2001) en las secuencias de PG1 y PG2.



```

361                                     420
ANIGPG2  SNIVMSGISDYGVVVIQQDYEDGKPT--GKPTNGVVTIQDVKLESVTGSDS--GATEIYLL
PG1      QNISLTNICKYGVVDVQQDYLNNGPT--GKPTNGVKISGIKFIKVTGTVAS--SAQDWYLL
PG2      DTITLSNIAKYGIVIEQDYENGSP--GTPTAGVPITDVTINKVTGTVKS--SGTDVYLL
PGX1     DTF-YHENNDNAITITQCYGQKNQTLTNEFFANLTIEDVTMKNFWGTVSTKYDPRAGSLV
PGX2     RNF-WGGNNEYTAFIDSCYFNINATTCAYPSRMNITNILFENFTGYSSGKYGNVAKLT

421                                     480
ANIGPG2  CGSGS---CSDWITWDDVKVTGGKKSTA---CKNFPSVA-----
PG1      CGDGS---CSGFITFSGNAITGGGKTSS---CNYPTNTC-----
PG2      CAN----CKNWTWITNNKVTGGKTSTK---CKGIPSGA-----
PGX1     CSAPDR--CSNIVAEDIKQVPSKKPPVYDCQNIDTSTLDITCRDPTNARDTT-----
PGX2     CSTSKDAVCENIKFKDFNIKTPCGGDPVFLCDGVKDIGVDCVSATSTAGKAALANKCVAP

481                                     495
ANIGPG2  -----SC.
PG1      -----PS.
PG2      -----SC.
PGX1     -----NG.
PGX2     QASASPFKVRKFNG.

```

Figura 1.5: Comparación de las secuencias de aminoácidos de las cuatro PGs de FORL. Se señalan en amarillo los motivos conservados en todas las PGs, en rojo los conservados en las PGs fúngicas, en recuadros rojos sólo los conservados en las ENDOPGs y en azul sólo los presentes en EXOPGs. Se introdujo en el análisis la secuencia de la ENDOPG de *A. niger* PG2 de donde se especifica la numeración de los motivos conservados para todas las PGs. Con flechas amarillas se señalan los motivos implicados tanto en la actividad de la enzima como en la unión al sustrato y con flechas negras se indican los motivos conservados en las EXOPGs señalados en la estructura terciaria en el apartado posterior.

Análisis de la estructura terciaria de las PGs de FORL.

Se obtuvo un modelo teórico de la estructura tridimensional de las cuatro poligalacturonasas de FORL mediante el uso del servidor SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Schwede, *et al.*, 2003). Se utilizaron las secuencias de aminoácidos a partir del lugar de corte de la proteína KEX en todos los casos, excepto en la PG2 que se utilizó la secuencia de aminoácidos sin el péptido señal. Dado que, esta herramienta necesita de modelos reales de proteínas similares obtenidos por cristalización se utilizaron las estructuras de las únicas PGs fúngicas obtenidas hasta la fecha, todas de tipo “endo”: las PGs de *F. moniliforme* (Genbank 1HG8), *A. aculeatus* (Genbank 1IA5) y *A. niger* (Genbank 1CZF).

Los modelos obtenidos se muestran en la figura 1.6. Los estructuras de las EXOPGs PGX1 y PGX2 obtenidas son modelos parciales de las regiones que comprenden desde ¹⁴⁵Leu hasta ³³⁹Asn en el caso de PGX2 y ¹⁵⁵Lys hasta

³⁴³Tyr en el caso de PGX1 debido a que las secuencias de aminoácidos fuera de esas regiones no presentaban la suficiente homología con las secuencias de las PGs utilizadas como modelos. Como se puede observar en la figura 1.6, las cuatro estructuras obtenidas conservan el modelo de hélice β paralela dextrógira postulado por Yoder, *et al.*, (1993). La estructura de las PGs está formada por repeticiones de giros formados por hélices β a su vez compuestos por varias láminas β unidas denominadas PB1, PB2a, PB2b y PB3 siguiendo la nomenclatura utilizada por Yoder para la pectato liasa C de *Erwinia chrysanthemi* (Yoder, *et al.*, 1993). En el caso de las ENDOPGs se puede observar los 10 giros completos de hélices β , mientras que las EXOPGs sólo aparecen representados seis de esos giros en los modelos obtenidos. También se pueden observar en las cuatro la presencia de las estructuras que conectan las láminas β , siendo los que unen dos giros distintos de hélices β los más variables y forman una hendidura en uno de los lados de la hélice β donde se va a localizar el centro activo.

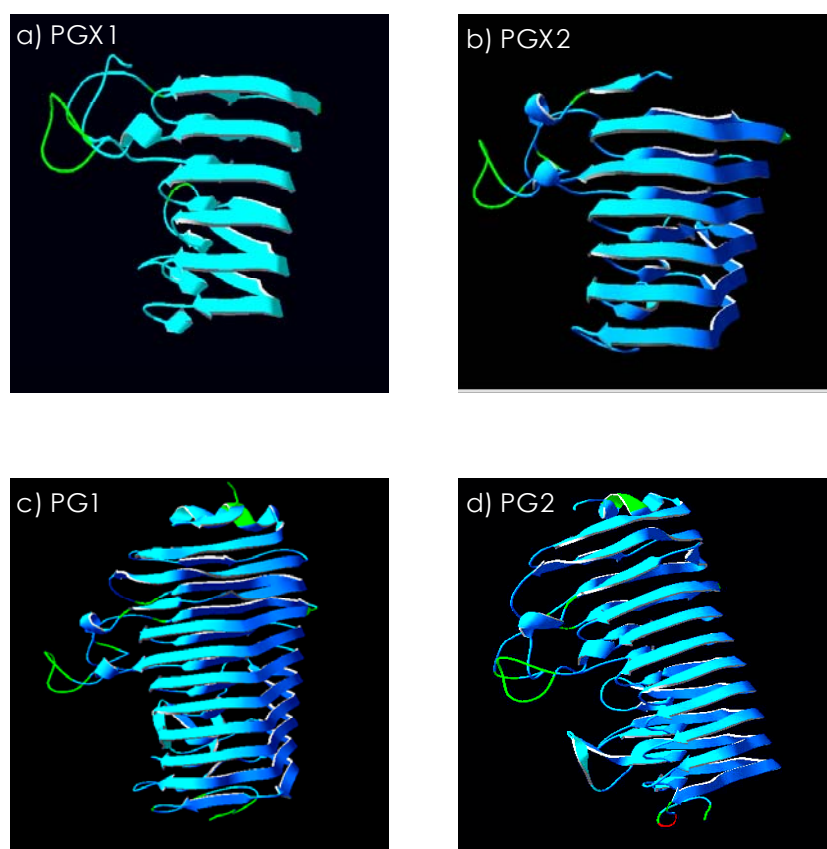


Figura 1.6: Estructura tridimensional teórica de las cuatro PGs de FORL, obtenida mediante el servidor SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). En el caso de las EXOPGs sólo se obtuvo el modelo teórico de la parte central de la proteína.

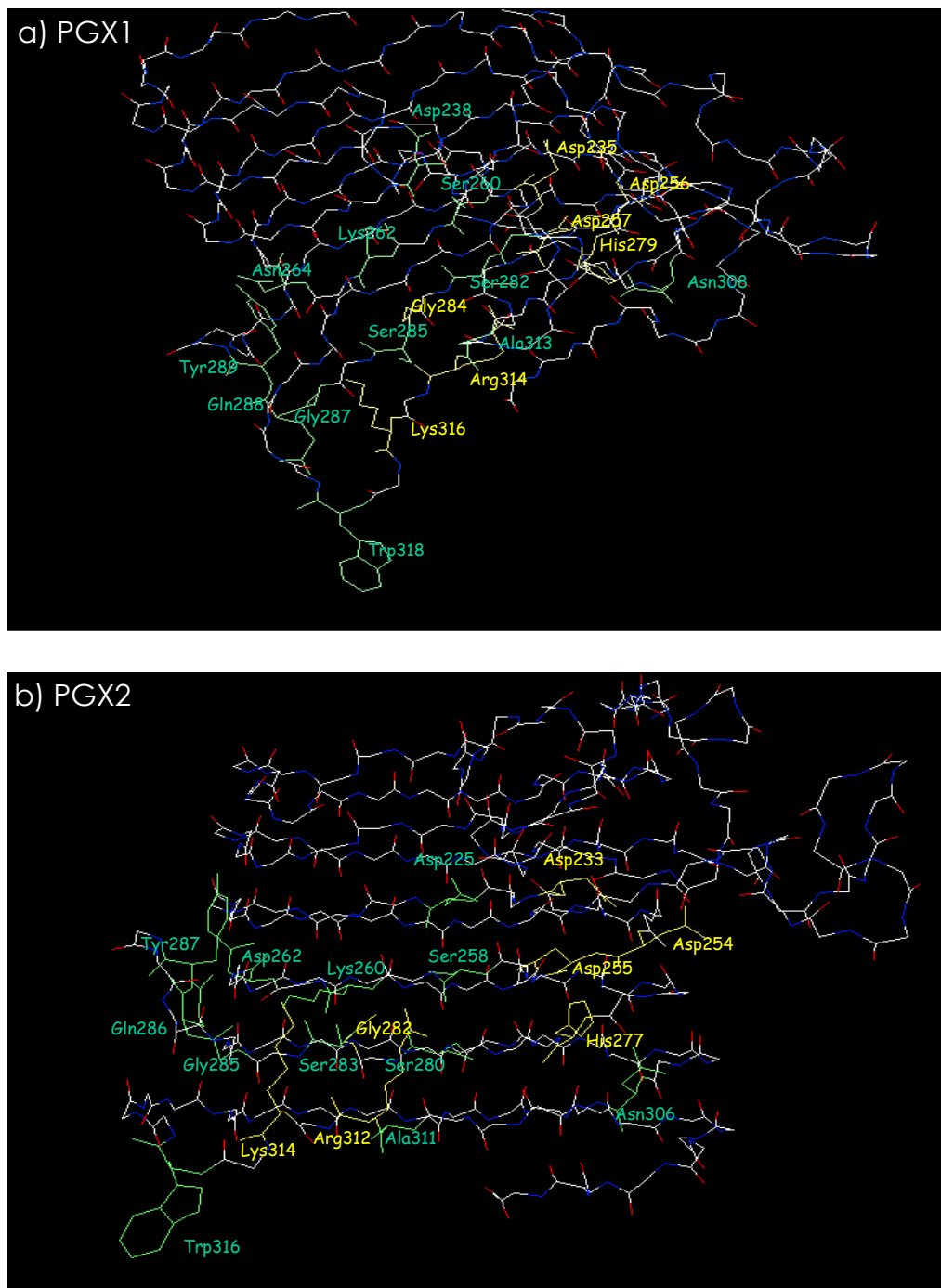


Figura 1.7: Representación de la estructura tridimensional teórica de PGX1 (a) y PGX2 (b). En amarillo se señalan los residuos implicados actividad catalítica y en la unión al sustrato descritos en ENDOPGs y en verde los residuos conservados en todas las EXOPGs que se sitúan cerca.

Todas las PGs fúngicas cuya estructura ha sido cristalizada hasta la fecha presentan un modo de acción “endo”, habiéndose caracterizado mediante mutaciones los residuos implicados en la actividad catalítica y en la unión al sustrato (van Santen, *et al.*, 1999) señalados en la figura 1.5 en amarillo. Por ello y dada la escasez de datos sobre EXOPGs, nos hemos servido de los modelos obtenidos de las dos EXOPGs de *F. oxysporum* para localizar los residuos implicados en la actividad catalítica y de unión al sustrato, así como, la de los motivos conservados específicos de EXOPGs presentes en las regiones modelizadas (Figura 1.7). Se puede observar en los modelos tridimensionales de PGX1 y PGX2 que, de todos los residuos conservados en las EXOPGs marcados en la figura 1.5 en azul, sólo algunos se encuentran situados cerca de los residuos implicados en la actividad catalítica y en los de unión al sustrato descritos para las PGs. Se puede observar en la figura 1.7 que los residuos : ²³⁶Asp, ²⁵⁸Ser, ²⁶⁰Lys, ²⁶²Asn, ²⁸⁰Ser, ²⁸³Ser, ²⁸⁵Gly, ²⁸⁶Gln, ²⁸⁷Tyr, ³⁰⁶Asn, ³¹¹Ala, ³¹⁶Trp (marcados en la figura 1.5 con flechas negras) se sitúan en ambos modelos cerca de los residuos ²³³Asp, ²⁵⁴Asp, ²⁵⁵Asp e ²⁷⁷His, implicados en la actividad catalítica, y de los dos implicados en la unión al sustrato: ³¹²Arg y ³¹⁴Lys (se sigue la numeración de PGX2).

DISCUSIÓN

Análisis de las secuencias de nucleótidos de las cuatro PGs de FORL.

Se han obtenido las secuencias genómicas y de cDNA de cuatro genes de PGs presentes en FORL. Dos de ellos presentan un modo de acción “exo” y otros dos un modo de acción “endo”. La secuencia completa de los cuatro genes incluye las regiones aguas abajo y aguas arriba lo que permitirá realizar un estudio comparativo de las regiones reguladoras (Capítulo 4).

Las cuatro proteínas presentan péptido señal, que estaría de acuerdo con el carácter de enzimas secretadas al medio tras su procesamiento. Estas enzimas parecen ser procesadas en dos pasos, uno en el que se produce un

corte en que libera el péptido señal y otro mediado por una proteasa tipo tripsina que corta liberando un pequeño pro-péptido, este hecho se ha observado en la PG2 de *A. niger* (Bussink, *et al.*, 1990). Se han detectado lugares de corte para la proteasa KEX2 (Calmels, *et al.*, 1991), en las secuencias de PGX1, PGX2 y PG1, pero no se han encontrado un lugar de corte de KEX2 en PG2, aunque no habría que descartar que existiera este tipo de procesamiento mediado por otra proteasa. En el caso de la PGX2 la secuencia del extremo amino terminal de la proteína nativa aislada del medio de cultivo (Patiño, 1998) permitió confirmar la existencia de procesamiento, ya que, coincidía con la secuencia teórica obtenida. Además el valor obtenido experimentalmente (50 kDa) para la proteína madura desglicosilada (de las Heras, *et al.*, 2003) se aproxima al deducido a partir de la secuencia de aminoácidos posterior al lugar de corte de la proteasa KEX (46,6 kDa).

Se puede observar en la tabla 1.1 que las cuatro presentan puntos isoeléctricos diferentes, siendo los de PGX1 y PG1 más ácidos (aproximadamente 6) y los de PGX2 y PG2 más alcalinos (aproximadamente 8). Estas diferencias podrían estar indicando la presencia de un “set endo-exo” funcionando en condiciones semejantes. En este aspecto existe variabilidad entre las PGs, normalmente el rango de pI de las PGs está entre 3,8 y 7,5 (Magro, *et al.*, 1980). En el caso de PG2, su pI es bastante similar al estimado para PG5 (8,3) de FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2001), no siendo así para PGX1 cuyo pI es más ácido que el estimado para PGX4 (8) en FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000). Estas diferencias que presentan PGs homólogas en distintos aislamientos pertenecientes a diferentes formas especiales podrían, tal vez, tener un significado funcional y estar relacionadas con las diferentes características de cada forma especial.

Asimismo, se puede observar en la figura 1.3 que las cuatro PGs presentan diferentes lugares de glicosilación, siendo su número mucho más abundante en las EXOPGs, situación que también se ha observado en las EXOPGs de *A. tubingensis* (Kester, *et al.*, 1999) y *C. carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998), además en el caso de PGX2 se ha comprobado experimentalmente

que está fuertemente glicosilada (Patino, *et al.*, 1997a). Este hecho podría ser de gran importancia para explicar las diversas isoformas que se detectan en cultivos *in vitro* (Posada, *et al.*, 2001). Aunque, como hemos visto, en FORL existen al menos cuatro genes codificadores de PGs que producen enzimas de distintas características, no habría que descartar la posibilidad de que se produjesen distintas isoformas a partir de cada uno de los genes, ya que, se ha comprobado en *F. moniliforme* que las cuatro isoformas de ENDOPG que secreta provienen mediante glicosilación diferencial, del transcrito de un único gen (Caprari, *et al.*, 1993a). Aunque existen pocas evidencias de la importancia de la glicosilación en relación con la actividad de las proteínas, sí se ha observado en *Aspergillus* que la deglicosilación de las PGs nativas lleva a una completa pérdida de la actividad de estas enzimas (Stratilova, *et al.*, 1998). Por otro lado, las glicoproteínas parecen estar implicadas en procesos relacionados con la interacción entre patógeno y huésped (Kukuruzinska, *et al.*, 1987).

Las secuencias codificadoras de las cuatro PGs descritas presentan características similares a las descritas para otros genes de hongos filamentosos en lo referente a la longitud, tamaño, número y posición de los intrones (Gurr, *et al.*, 1987).

En la mayoría de los hongos filamentosos los genes con funciones relacionadas no suelen estar ligados y se distribuyen al azar a lo largo del genoma del hongo (Gurr, *et al.*, 1987). Un indicio de que al menos el gen *pg2* podría no situarse en *tandem* con el resto es que la región aguas arriba de su promotor presenta homología con un gen de función desconocida de *Neurospora crassa* y con una hidroxilasa de *Burkholderia fungorum* (Genbank ZP_00028690). Asimismo, se ha comprobado que el gen de ENDOPG de *F. moniliforme* está situado en un único cromosoma (Migheli, *et al.*, 1993).

Las señales de inicio de la transcripción que se pueden observar en las regiones aguas arriba de los cuatro genes se corresponden con lo descrito para hongos filamentosos. Las cajas TATA están situadas entre 80 y 180 pb antes del codón de inicio ATG y 30 pb antes del punto consenso de inicio de la

transcripción. Éste suele estar localizado en *S. cerevisiae* dentro de la secuencia PyAAG, aunque no siempre está presente en hongos filamentosos (Unkles, 1992). Una secuencia similar esta presente en los genes *pgx2* y *pg1*, estando ausente en los otros dos. Asimismo las cajas CAAT suelen estar situadas entre 60 y 200 pb antes del sitio de inicio de la transcripción (Unkles, 1992). La secuencia consenso alrededor del codon ATG descrita para eucariotas superiores (CCACC) no se corresponde con la situada inmediatamente antes del codon de inicio de los cuatro genes, aunque en los cuatro casos está conservada la A en la posición -3 (Figura 1.3) y en el caso del gen *pg1* y *pgx1* la secuencia ATCACA se corresponde completamente con la descrita en *Neurospora crassa* (Legerton y Yanofsky, 1985). Asimismo, tampoco se ha observado la presencia de la secuencia AATAAA implicada en la poliadenilación del mRNA, aunque sí está presente a una distancia aceptable en los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* la secuencia TAGT idéntica a la secuencias de poliadenilación descritas en levaduras (Zaret y Sherman, 1982) y descrita también en el gen de ENDOPG *pga* de *F. moniliforme* (Caprari, *et al.*, 1993b).

El tamaño de los intrones y las secuencias consenso para su procesamiento se ajustan a lo descrito para hongos filamentosos. Las secuencias de los extremos 5' GTPuNGPy y 3'PyAG parecen ser algo más flexibles que las descritas en plantas y en vertebrados (Brown, *et al.*, 1996), no obstante la secuencia consenso interna CTPuAPy parece ser mucho más flexible conservándose en general sólo tres de las posiciones CTNAN, hecho que se acerca más a lo descrito en plantas (PyTNAN) que a las secuencias menos flexibles de vertebrados (CTPuAPy o PyTPuAPy) (Brown, *et al.*, 1996). Por otro lado, se puede observar que tanto la posiciones, el número de los intrones, así como las fases en las que se encuentran son distintas en cada uno de los genes (Tabla 1.2). La variación en número, posición y fase de los intrones de los cuatro genes podría indicar que la divergencia a partir de un gen de PG ancestral es anterior a la divergencia de las especies de hongos en los que están presentes.

Por otro lado, el mayor contenido en G+C de las regiones codificadoras (Tabla 1.3), característica general de las regiones codificadoras, podría estar relacionado con el hecho de que en hongos filamentosos exista una tendencia a utilizar codones que terminen con C en vez de aquellos terminados en A (Unkles, 1992).

Comparación de las secuencias de aminoácidos de las cuatro poligalacturonasas de FORL.

La baja similitud detectada entre las secuencias de las cuatro PGs podría ser un indicativo de que estos cuatro genes no pertenecen a la misma familia y que su divergencia es antigua. Este hecho también ocurre en los genes descritos en otras especies como *C. carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1990; Scott-Craig, *et al.*, 1998) o en el caso de los genes de PGs descritos en FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2001; Garcia-Maceira, *et al.*, 2000; Di Pietro y Roncero, 1998), aunque existen casos de PGs cuya identidad es mayor, ya que, pertenecen a la misma familia como algunos de los descritos en *B. cinerea* (Wubben, *et al.*, 1999).

Se puede observar en la figura 1.5, la presencia de todas las regiones características de PGs (Caprari, *et al.*, 1993b; Kitamoto, *et al.*, 1993; Reymond, *et al.*, 1994; Stratilova, *et al.*, 1998), así como los motivos característicos de PGs fúngicas y ENDOPGs fúngicas propuestos por Markovic y Janecek (2001). Como se puede observar las dos ENDOPGs de FORL presentan los motivos descritos para PGs más importantes. Sin embargo, en el caso de las EXOPGs fúngicas, la información es más limitada por el escaso número de estas enzimas representadas en el análisis realizado por Markovic. En el presente trabajo se han caracterizado dos nuevas EXOPGs, una de las cuales presenta bastantes diferencias con respecto a las introducidas en el análisis de Markovic y Janecek, por lo que, se ha realizado un análisis comparativo de todas las EXOPGs descritas incluyendo las dos de FORL así como la EXOPG descrita en *A. nidulans* (GenBank AY237304) que tampoco había sido incluida en dicho trabajo (Markovic y Janecek, 2001). Este análisis nos permitió depurar los

motivos conservados propuestos por Markovic para las EXOPGs, por ello, en la figura 1.5 se muestran motivos conservados de EXOPG fúngicas tras la realización de dicho análisis en las EXOPGs de FORL. La caracterización de nuevos genes de EXOPGs y su inclusión en análisis comparativos permite realizar una mejor aproximación de cuales son los motivos que realmente están conservados y por lo tanto, cuáles son los que podrían tener un significado funcional.

Análisis de la estructura terciaria de las PGs de FORL.

Se han obtenido los modelos tridimensionales teóricos de las dos ENDOPGs de FORL, los cuales se ajustan a los estructuras tridimensionales descritas en la literatura para distintas ENDOPGs (Federici, *et al.*, 2001; Cho, *et al.*, 2001).

También, y dado que no existe hasta la fecha el modelo tridimensional de ninguna EXOPG se han obtenido los modelos tridimensionales parciales de las dos EXOPGs.

Pese a la escasa similitud entre las cuatro estructuras primarias de las PGs descritas en este trabajo se puede observar que la estructura terciaria está altamente conservada. Esto podría ser debido a que la modelización es teórica y se basa en estructuras cristalizadas reales de tres ENDOPGs de *F. moniliforme* (1HG8), *A. aculeatus* (1IA5) y *A. níger* (1CZF). No obstante la similitud existente entre las estructuras de la PG2 de *A. níger*, la PG de *F. moniliforme* (Federici, *et al.*, 2001) y la PG bacteriana de *E. carotovora* (van Santen, *et al.*, 1999) hace que se puedan fácilmente superponer, a pesar de que la identidad de sus estructuras primarias es solamente del 43,5% y 19%, respectivamente. Este hecho apoya la validez de los modelos obtenidos e indicaría un cierto grado de redundancia en la estructura de todas las pectinasas, tal vez condicionada por el sustrato (pectina).

Dada la escasa información sobre la estructura terciaria de las EXOPGs, se han utilizado los modelos teóricos obtenidos para situar los residuos implicados en la actividad catalítica y en unión al sustrato descritos en ENDOPGs (numeración de la PGX2): ²³³Asp, ²⁵⁵Asp encargados de capturar una molécula de agua y ²⁵⁴Asp que sería el encargado de donar un protón (van Santen, *et al.*, 1999). Asimismo, la ²⁷⁷His parece estar implicada en la actividad catalítica ya que una mutación en dicho residuo produce la disminución de la actividad en la ENDOPG de *F. moniliforme* (Caprari, *et al.*, 1996). Los residuos ³¹²Arg y ³¹⁴Lys, sin embargo, parece que estarían implicados en la unión al sustrato (van Santen, *et al.*, 1999). Estos motivos, junto con la ²⁸²Gly altamente conservada, pero a la que no se le ha asignado una función, aparecen señalados en los modelos obtenidos de PGX1 y PGX2 (Figura 1.7) en color amarillo. También han sido señalados en verde los residuos conservados sólo en las EXOPGs y que se sitúan cerca de los residuos de unión al sustrato y a los implicados en la actividad catalítica. Se puede observar que los residuos ²³⁶Asp, ²⁵⁸Ser, ²⁶⁰Lys, ²⁶²Asp, ²⁸⁰Ser, ²⁸³Ser, ²⁸⁵Gly, ²⁸⁶Gln, ²⁸⁷Tyr, ³⁰⁶Asn, ³¹¹Ala, ³¹⁶Trp, quedan situados cerca del centro catalítico, por lo que podrían estar relacionados con el modo de acción “exo”. Los residuos situados cerca de los de unión al sustrato descritos para las ENDOPGs (van Santen, *et al.*, 1999) podrían ser relevantes para que se produjera un cambio en la forma de unión de la pectina, de forma que el centro catalítico sólo pudiera actuar liberando monómeros o dímeros del extremo no reductor de la pectina, facilitando el modo de acción “exo”. Aún así, no habría que descartar que residuos conservados en regiones situadas fuera de las que forman el modelo también estuvieran relacionados con el modo de acción de estas proteínas.

El ³¹⁶Trp presente, únicamente en las EXOPGs de hongos y las PGs de plantas parece que podría estar relacionado con la actividad y con la interacción de las PGs con las PGIPs (proteínas inhibitoras de las poligalacturonasas). Se ha observado que la inclusión de este residuo en la PG de *F. moniliforme* produce una disminución de la actividad específica así como anula la interacción de esta PG con la PGIP-2 de *Phaseolus vulgaris* (Federici, *et al.*, 2001). Se ha comprobado que las PGIPs interaccionan con las

ENDOPGs para inhibir su acción evitando la rápida degradación de la pared. Este residuo presente en las EXOPGs, podría ser de gran importancia en la interacción huésped patógeno, ya que, la acción de enzimas que no interaccionen con las PGIPs y con modo de acción “exo” podrían degradar los oligogalacturónicos, inductores de la respuesta de defensa de la planta, favoreciendo en el desarrollo de la infección por parte del patógeno.

Capítulo 2

Variabilidad y relación evolutiva de PGs

INTRODUCCIÓN.

Las poligalacturonasas son unas enzimas altamente polimórficas, que presentan una considerable variación en sus características físico-químicas. Se ha observado en los cultivos de *Fusarium* la presencia de numerosas isoformas de estas proteínas. Existe diversidad dentro de un mismo aislamiento, como en el caso de FORL, en el que se detectaron en cultivos cuatro formas de poligalacturonasas (Guevara, *et al.*, 1997). Pero también existe una gran diversidad en las formas de estas enzimas entre distintos aislamientos del mismo género y de la misma especie (Posada, *et al.*, 2001). Esta variabilidad, así como, la diversidad fisiológica y morfológica entre aislamientos sugiere una diversidad de estas enzimas dentro del género y de la especie. Además, este hecho podría estar relacionado con la especificidad de huésped y de producción de síntomas aunque hasta ahora no hay evidencias concluyentes.

Tras la caracterización de las secuencias de genes codificadores de PGs en FORL nos planteamos cual sería el grado de divergencia de estos genes dentro del género y a nivel intra-específico. Previamente, se había realizado un estudio del grado de divergencia del gen *pg1*, en diversos aislamientos de *Fusarium* pertenecientes a distintas secciones del género (Posada, *et al.*, 2000). En dicho estudio se observó que una gran parte de la secuencia del gen *pg1* estaba altamente conservada entre los distintos aislamientos del género *Fusarium*.

La presencia en el GenBank de secuencias de genes codificadores de EXOPGs de hongos es, hasta la fecha muy inferior a la de ENDOPGs. Actualmente sólo han sido caracterizados 5 genes codificadores de exopoligalacturonasas en hongos filamentosos además de los caracterizados en este trabajo: una en FOL (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000), *Aspergillus tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996), *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998), *Aspergillus nidulans* (GenBank. AY237304) y *Botryotinia fuckeliana* (GenBank AF145229). Aunque se ha descrito la presencia de EXOPGs en

otras especies de hongos (Dos, *et al.*, 2002; Rha, *et al.*, 2001; Sakamoto, *et al.*, 2002) sus secuencias codificadoras no se conocen.

Debido tal vez a la escasez de genes codificadores de EXOPGs descritos hasta ahora, no existen datos acerca del grado de divergencia de dichos genes dentro de cada género. Por ello, nos propusimos analizar si la similitud de estos genes dentro del género *Fusarium* era del mismo orden de la descrita para la ENDOPGs. Para ello, nuestro primer objetivo fue determinar el grado de variabilidad de la región más variable (amino-terminal) de los genes *pgx1* y *pgx2* comparando las secuencias de aminoácidos las dos EXOPGs de distintos aislamientos de *F. oxysporum* y de algunas especies de *Fusarium* pertenecientes a distintas secciones, e incluyendo las secuencias de los intrones de ambos genes para evaluar su posible uso en análisis filogenéticos.

Como segundo objetivo nos planteamos determinar cual sería la situación evolutiva de los genes descritos en FORL con respecto a los ya descritos, tanto en hongos como plantas. Para realizar este análisis usamos una amplia representación de distintas PGs , especialmente fúngicas.

MATERIAL y MÉTODOS.

Material biológico y cultivos.

Para la realización de este trabajo se han utilizado los aislamientos FORL r6 y FORL r2, el aislamiento de FOL 1a (aislados de plantas de tomate infectadas y cedidos por el Dr. Tello, INIA, Madrid) y aislamientos de los hongos *F. equiseti*, *F. roseum*, *F. oxysporum* aislados de piñones de piñas cerradas de *Pinus pinea* L. y cedidos por la Dra. Muñoz del Departamento de Zoología, Enfermedades y Plagas Vegetales de la Escuela de Ingenieros Técnicos Forestales de La Universidad Politécnica de Madrid.

El hongo fue cultivado en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo Sabouraud (Scharlau, España). Los cultivos fueron

inoculados con discos miceliales de 1cm de diámetro cortados de los márgenes de colonias de 7 días e incubados a 25 °C en estático. Los micelios fueron recogidos a diferentes tiempos por filtración a través de papel Whatman No. 1, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C para los ensayos con DNA .

Extracción de ácidos nucleicos y electroforesis de DNA.

La extracción de DNA y las electroforesis se realizaron según los métodos descritos en el capítulo anterior.

Obtención de las secuencias parciales de *pgx1* y *pgx2*.

Para realizar las reacciones de PCR se utilizaron como cebadores *pgx1up/pgx1rv*, así como *pgx2up/pgx2rv* descritos en el material y métodos del capítulo 1 (Obtención de sondas específicas de PGs) y cuya localización en la secuencia completa se indica en la figura 2.1. Se amplificó 150 ng de DNA genómico de FORL r6 y FORL r2 , FOL 1a, *F. roseum*, *F. equiseti* y el aislamiento obtenido de piñones de *F. oxysporum* con ambas parejas de oligos y con la enzima Taq polimerasa (Promega, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar las amplificaciones se utilizó el termociclador Peltier PTC-100 (M.J. Research Inc., USA) y el siguiente programa con los cebadores *pgx1up* y *pgx2rv*: un paso previo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C seguido de 32 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 52 °C (anillamiento) y 2 minutos a 72 °C (extensión). Por último, un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C y parada a 4 °C. Con los cebadores *pgx2up* y *pgx2rv* se utilizó el mismo programa pero con sólo 29 ciclos y una temperatura de anillamiento de 48 °C. Los productos de amplificación se observaron en todos los casos en geles de agarosa al 1%, obteniéndose una banda de 637 pb cuando se utilizaron de los cebadores *pgx1up-rv* y de 755 pb en el caso de los cebadores *pgx2up-rv*.

Todos los productos de amplificación se clonaron siguiendo el proceso descrito en el material y métodos del capítulo primero (Obtención de sondas específicas de PGs).

Secuencias utilizadas presentes en el Genbank.

Las secuencias codificadoras de PGs obtenidas del Genbank y utilizadas en los análisis, además de las caracterizadas en FORL en el capítulo primero, se recogen en la tabla 2.1.

	ENDOPGs fúngicas		Nomenclatura utilizada
PGAB	<i>A. niger</i>	Genbank Y18805	PGBASPNG
PGAC	<i>A. niger</i>	Genbank X64356	PGCASPNG
PGA2	<i>A. tubingensis</i>	Genbank X58894	PG2ASPTU
PGR	<i>C. carbonum</i>	Genbank P26215	PGRCOCCA
PGR	<i>F. moniliforme</i>	Genbank Q07181	PGRFUSMO
PG1	<i>S. sclerotiorum</i>	Genbank L12023	PG1SCSCL
PG1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Genbank AB000124	PG5FO
PG5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Genbank AF078156	PG1SCSCL
PG1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Genbank AY485190	PG2ASPTU
PG2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Genbank AY485189	
	PGs plantas		
PG1	<i>Brassica napus</i>	Genbank X95800	PG1BRANA
EXOPG	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Genbank X72292	EXOPGATHAL
EXOPG	<i>Medicago sativa</i>	Genbank U20431	EXOPGMEDSA
	EXOPGs fúngicas		
PGA	<i>A. tubingensis</i>	Genbank X99795	PGXAASPTU
PGX	<i>B. fuckeliana</i>	Genbank AF145229	PGXBOTFU
PGX1	<i>C. carbonum</i>	Genbank L48982	PGX1COCCA
PGX4	<i>F. oxysporum</i>	Genbank AF083075	PGX4FO
EXOPG	<i>A. nidulans</i>	Genbank AY237304	EXOPGASPND
PGX1	<i>F. oxysporum</i>	Genbank AF395107	PGX1COCCA
PGX2	<i>F. oxysporum</i>	Genbank AF136444	PGX2
	PG bacteriana		
PEHX	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Genbank P15922	PEHXECRY

Tabla 2.1: Secuencias de PGs presentes en el Genbank y utilizadas en el análisis filogenético

Análisis de secuencias.

Un primer análisis se realizó alineando, mediante el método CLUSTAL del programa MegAlign, las secuencias de aminoácidos de las poligalacturonasas de FORL con las PGs que aparecen en la tabla 2.1. Para la comparación de secuencias de aminoácidos se utilizó el paquete de programas PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989), usando el método de Dayhoff PAM (programa PROTDIST) para calcular las matrices de distancias para la secuencias de aminoácidos. Los dendrogramas se obtuvieron con el método UPGMA del programa NEIGHBOUR. Los análisis “bootstrap” se realizaron utilizando los programas SEQBOOT y CONSENSE. Los dendrogramas fueron visualizados mediante el programa TreeView (Page, 1996).

RESULTADOS.

Comparación de secuencias parciales de exopoligalacturonasas en distintos aislamientos del género *Fusarium*.

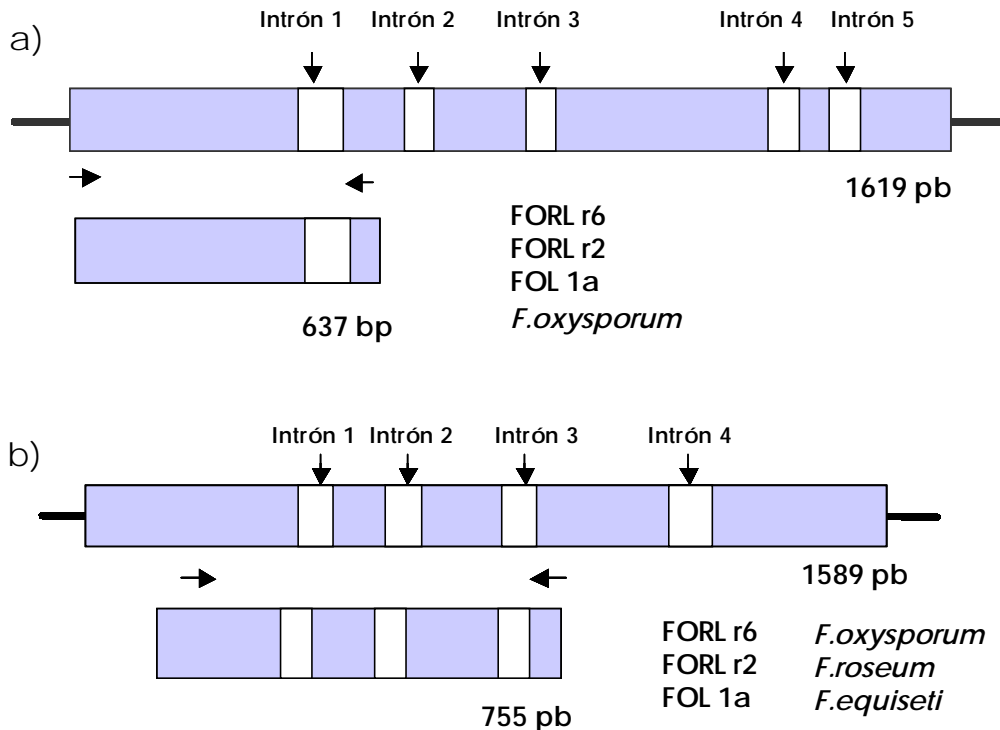


Figura 2.1: Esquemas de los genes completos *pgx1* (a) y *pgx2* (b). Se señalan con flechas los cebadores que han sido utilizados para obtener los fragmentos de 637 pb en el caso de *pgx1* y 755 pb en el caso de *pgx2* en los aislamientos de *Fusarium* indicados en cada caso.

Se ha realizado un análisis de la secuencia parcial de los genes *pgx1* y *pgx2* en varios aislamientos del género *Fusarium*. En la figura 2.1 se muestra la estructura de los genes así como las regiones obtenidas por PCR y posterior secuenciación de los fragmentos. Se obtuvo un producto de amplificación de 637 pb cuando se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes al gen *pgx1* y de 755 pb cuando se utilizaron los correspondientes al gen *pgx2*. Para este trabajo se eligieron fragmentos que estaban localizados en las regiones correspondientes a los extremos amino-terminales de ambas proteínas, ya que son las regiones que presentan un menor número de residuos conservados. Las secuencias obtenidas incluían el intrón 1 en el caso del gen *pgx1* y los intrones 1, 2 y 3 en el caso del *pgx2*.

Como muestra la figura 2.1 se obtuvieron fragmentos del gen *pgx2* en los aislamientos r6 y r2 de FORL, 1a de FOL y en los aislamientos utilizados de *F. oxysporum*, *F. roseum* y *F. equiseti*. En el caso del gen *pgx1* no se pudo obtener la secuencia parcial en los aislamientos de *F. equiseti* y *F. roseum*.

Se compararon las secuencias de aminoácidos parciales de cada EXOPG en los diferentes aislamientos del genero *Fusarium* mediante el método CLUSTAL del programa MegAlign (DNASar, USA). El resultado de los alineamientos se muestra en la figura 2.2. Se puede observar en ambos casos que existe un alto grado de similitud entre las secuencias obtenidas siendo el porcentaje de 100% en el caso de PGX1 y entre 97,5 y 100% en el caso de PGX2.

a)

	1	60
FORLr6	VAVSVLVSSVVGTSRRNSALPKRPHVEAAPYGTGKAFPASPARSRKDFCYVNPgKGNVD	
FORLr2	VAVSVLVSSVVGTSRRNSALPKRPHVEAAPYGTGKAFPASPARSRKDFCYVNPgKGNVD	
FOL 1a	VAVSVLVSSVVGTSRRNSALPKRPHVEAAPYGTGKAFPASPARSRKDFCYVNPgKGNVD	
<i>F. oxysporum</i>	VAVSVLVSSVVGTSRRNSALPKRPHVEAAPYGTGKAFPASPARSRKDFCYVNPgKGNVD	
	61	120
FORLr6	DAPSIKAFKCKNKGTTIVLDQKYSIASPLDLTWLAHVDVITITGEVNFKSDPYYWADHSF	
FORLr2	DAPSIKAFKCKNKGTTIVLDQKYSIASPLDLTWLAHVDVITITGEVNFKSDPYYWADHSF	
FOL 1a	DAPSIKAFKCKNKGTTIVLDQKYSIASPLDLTWLAHVDVITITGEVNFKSDPYYWADHSF	
<i>F. oxysporum</i>	DAPSIKAFKCKNKGTTIVLDQKYSIASPLDLTWLAHVDVITITGEVNFKSDPYYWADHSF	
	121	180
FORLr6	KYDFQNMSSFVKIGGKDIHIYGDLTGKESLLDGHGQAYWEEMAVNKTLRLPILLTIEDAH	
FORLr2	KYDFQNMSSFVKIGGKDIHIYGDLTGKESLLDGHGQAYWEEMAVNKTLRLPILLTIEDAH	
FOL 1a	KYDFQNMSSFVKIGGKDIHIYGDLTGKESLLDGHGQAYWEEMAVNKTLRLPILLTIEDAH	
<i>F. oxysporum</i>	KYDFQNMSSFVKIGGKDIHIYGDLTGKESLLDGHGQAYWEEMAVNKTLRLPILLTIEDAH	

	181	193	
FORLr6	GLTMSNLRMRNRP		
FORLr2	GLTMSNLRMRNRP		
FOL 1a	GLTMSNLRMRNRP		
<i>F. oxysporum</i>	GLTMSNLRMRNRP		
b)			
	1		60
FORLr6	VYTIrHskNDNDdVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDLtFLNDIhVHLEGE		
FORLr2	VYTIrHskNDNDdVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDLtFLNDIhVHLEGE		
FOL 1a	VYTIrHskNDHDDVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDLtFLNDIhVHLEGE		
<i>F. oxysporum</i>	VYTIrHskNDNDdVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDpTFLNDIhVHLEGE		
<i>F. equiseti</i>	VYTIrHskNDNDYVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDLtFLNDIhVHLEGE		
<i>F. roseum</i>	VYTIrHskNDNDdVSSEfYkGLkKANKGGtLYLpKGQTFVIGkPLDLtFLNDIhVHLEGE		
	61		120
FORLr6	IKfTNDTEYwQkNVYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
FORLr2	IKfTNDTEYwQkNAYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
FOL 1a	IKfTNDTEYwQkNAYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
<i>F. oxysporum</i>	IKfTNDTEYwQkNAYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
<i>F. equiseti</i>	IKfTNDTEYwQkNAYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
<i>F. roseum</i>	IKfTNDTEYwQkNAYkHPfQNSImfWkWGgKnIkLYGkGVLNGNGQRwWNEfAGKEILDt		
	121		180
FORLr6	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISfKdVICTARSTNATALPK		
FORLr2	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISfKdVICTARSTNATALPK		
FOL 1a	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISfKdVICTARSTNATALPK		
<i>F. oxysporum</i>	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISfKdVICTARSTNATALPK		
<i>F. equiseti</i>	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISLkDVLCTARSNATALPK		
<i>F. roseum</i>	TNAYLRpILfYAQNATnLDIqGVHfKdSPcWtNfVvTskDISfKdVICTARSTNATALPK		
	181	202	
FORLr6	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		
FORLr2	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		
FOL 1a	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		
<i>F. oxysporum</i>	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		
<i>F. equiseti</i>	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		
<i>F. roseum</i>	NTDFFDsLNvENLNvERAVvDI		

Figura 2.2: Comparación mediante el método Clustal de las secuencias parciales de la PGX1(a) y de la PGX2 (b) en distintos aislamientos de *Fusarium*: FORL r6 y r3, *Fusarium* FOL 1a, *F. oxysporum*, *F. equiseti* y *F. roseum*. En amarillo se señalan los aminoácidos conservados en todas.

Asimismo, se alinearon y compararon los intrones de cada uno de los genes en los distintos aislamientos (Figura 2.3). Para el gen *pgx2* las similitudes observadas oscilaron entre el 57,8 y 100 % (intrón 1), entre 47,9 y 100% (intrón 2) y entre el 51 y 100 % (intrón 3). Para el intrón 1 del gen *pgx1* presentó valores de similitud entre 89,7 % y el 100% (Tabla 2.2).

a)	1	intrón 1	59
<i>F. oxysporum</i>	<u>GTAAGTCGTGATATATCCAGCACTACTCCGTTTCCAGTCGATACTAAATTGTCATAAAG</u>		
FOL 1a	<u>GTAAGTCGCGATATATCCAGCACTACTCCGTTTCCAGTCGATACTAAATTGTCATAAAG</u>		
FORL r2	<u>GTAAGTCGTGATATATCCAGCACTACTCCGTTTCCAGTCGATACTAAATTGTCATAAAG</u>		
FORL r6	<u>GTAAGTCGTGATATATCCAGCACTACTCCGTTTCCAGTC-ATACTAAATTGTCATAAAG</u>		



Figura 2.3: Alineamiento del intrón 1 de la secuencia del gen *pgx1* (a) y de las secuencias de los intrones 1, 2 y 3 del gen *pgx2* (b) en distintos aislamientos de *Fusarium*. Los motivos implicados en el procesamiento están subrayados.

a)		FORL r2	FOL 1a	<i>F. oxysporum</i>
	FORL r6	91,4	89,7	91,4
	FORL r2		98,3	100
	FOL 1a			98,3

b)		<i>F. roseum</i>	FOL 1a	FORL r2	FORL r6	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>F. roseum</i>	77,8	60,9	100	100	82,2
<i>F. roseum</i>			57,8	77,8	77,8	97,8
FOL 1a				60,9	60,9	62,2
FORL r2					100	82,2
FORL r6						82,2

		Intrón 1			
	<i>F. roseum</i>	FOL 1a	FORL r2	FORL r6	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. equiseti</i>	50	47,9	100	100	50
<i>F. roseum</i>		73,5	50	50	100
FOL 1a			47,9	47,9	73,5
FORL r2				100	50
FORL r6					50

		Intrón 2			
	<i>F. roseum</i>	FOL 1a	FORL r2	FORL r6	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. equiseti</i>	67,3	70	100	100	67,3
<i>F. roseum</i>		51	67,3	67,3	100
FOL 1a			70	70	51
FORL r2				100	67,3
FORL r6					67,3

		Intrón 3			
--	--	----------	--	--	--

Tabla 2.2: Porcentajes de similitud obtenidos mediante el método Clustal del programa Megalign, de las secuencias de el intrón 1 del gen *pgx1* (a) y los intrones 1, 2 y 3 del gen *pgx2* entre los distintos aislamientos de *Fusarium* analizados.

Comparación de las PGs de FORL con otras poligalacturonasas descritas.

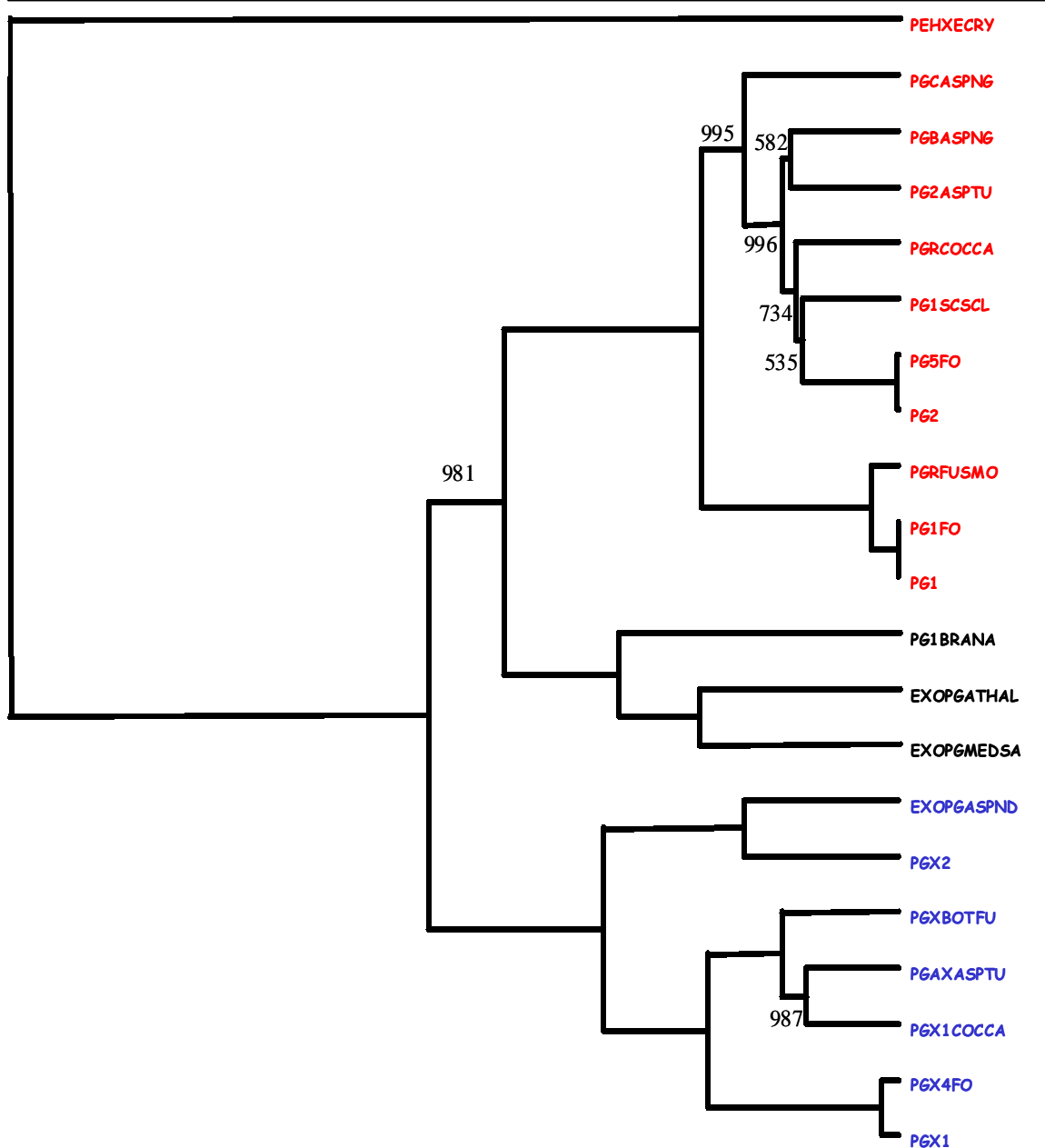
Se ha realizado una comparación de las secuencias completas de las PGs de FORL descritas en el capítulo primero, con diversas PGs de hongos filamentosos. Se han incluido en el análisis, junto con las secuencias de aminoácidos completas deducidas de los cuatro genes de PG de FORL, otras ENDOPGs de hongos filamentosos representativas de grupos presuntamente monofiléticos (Wubben, *et al.*, 1999), todas las EXOPGs descritas hasta la fecha y diversas PGs de plantas de diversos clados (Markovic, *et al.*, 2001). Las secuencias utilizadas aparecen en la tabla 2.1.

El resultado del análisis filogenético se muestra en la figura 2.4. Se puede observar que las PGs fúngicas se distribuyen en dos grupos claramente separados, uno que contiene todas las ENDOPGs y otro con las EXOPGs. Por tanto, es posible apreciar una clara división de las PGs por su modo de acción.

Dentro del grupo donde se distribuyen las ENDOPGs fúngicas se puede observar la existencia de dos ramas una de las cuales se divide en diversos grupos. También se puede observar la presencia de dos ramas distintas en las que se distribuyen las EXOPGs fúngicas.

Asimismo, se puede observar que las PGs pertenecientes a las mismas especies aparecen situadas en grupos distintos. En concreto las dos ENDOPGs de FORL aparecen claramente en grupos distintos, siendo la PG2 más similar a las demás ENDOPGs presentes en otras especies de hongos. Sin embargo la PG1 parece agruparse únicamente con las ENDOPGs descritas en *Fusarium*. Por otro lado, las EXOPGs de FORL también se sitúan en grupos situados en distintas ramas.

Las PGs de plantas aparecen distribuidas en un tercer grupo distinto a las PGs fúngicas estando más próximas a las ENDOPGs que a las EXOPGs de hongos.



01

Figura 2.4: Dendrograma hecho mediante el método UPGMA con secuencias de PGs. Los valores de Bootstrap menores de 1000 del árbol consenso se dan al lado de las ramas. La longitud de las ramas es proporcional a la distancia genética. Además de las secuencias de PGX1, PGX2, PG1 y PG2 de FORL se incluyen: *Erwinia chrysantemi* PG (PEHXECRY, Genbank P15922), *Arabidopsis thaliana* EXOPG (EXOPGATHAL, Genbank X72292), *Medicago sativa* EXOPG (EXOPGMEDSA, Genbank U20431), *Brassica napus* PG1 (PG1BRANA, Genbank X95800). Las EXOPGs: *Aspergillus tubingensis* PGA (PGAXASPTU, Genbank X99795), *Botrytina fuckeliana* PGX (PGXBOTFU, Genbank AF145229), *Cochliobolus carbonum* PGX1 (PGX1COCCA, Genbank L48982) *A. nidulans* EXOPG (EXOPGASPND, Genbank AY237304) y FOL PGX4 (PGX4FO, Genbank AF395107). Las ENDOPGs de los grupos propuestos por Wubben (Wubben, *et al.*, 1999): I (PGBASPNG, Genbank Y18805, *A. niger*), II (PG2ASPTU, Genbank P19805, *A. tubingensis*), III (PG1SCSCL, Genbank L12023, *Sclerotinia sclerotiorum*), IV (PGCASPNG, Genbank X64356, *A. niger*) y del V: PGR de *F. moniliforme* (PGRFUSMO Genbank Q07181.), PG1 de FOL (PG1FO Genbank AB000124), PGR de *C. carbonum* (PGRCOCCA, Genbank P26215.) y PG5 FOL (PG5FO, Genbank AF078156). En azul se resaltan las EXOPGs y en rojo las ENDOPGs fúngicas.

DISCUSIÓN.

Comparación de secuencias parciales de EXOPGs en distintos aislamientos del género *Fusarium*.

Como una primera aproximación, para el estudio de la variabilidad que presentan las EXOPGs dentro del género *Fusarium* se ha realizado el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de las secuencias parciales de los genes *pgx1* y *pgx2*. en cepas de *F. oxysporum* y dos especies de *Fusarium* consideradas distantes de la sección *Elegans* a la que pertenece *F. oxysporum*.

El alto grado de similitud en las secuencias de las dos EXOPGs entre los distintos aislamientos de *F. oxysporum* podría ser un indicativo de una baja variabilidad genética dentro del género. Sin embargo, existen estudios en los que se observa que regiones no codificadoras como las regiones intergénicas espaciadoras (IGS) del rRNA reflejan la existencia de suficiente variabilidad para distinguir entre distintos aislamientos de *F. oxysporum* (Appel y Gordon, 1996).

La comparación de la secuencia de aminoácidos correspondiente al gen *pgx2* con respecto a las otras especies del género *Fusarium* (*F. equiseti* y *F. roseum*) también indicó un grado de similitud muy elevado, mayor que el observado en el caso del gen *pg1* (Posada, *et al.*, 2000). Considerando que la región obtenida, en el caso de *pgx2*, corresponde al extremo amino-terminal de la proteína y que es la que menos motivos conservados presenta, podemos concluir que esta proteína está altamente conservada en diferentes aislamientos del género *Fusarium*. La escasa variabilidad observada podría indicar un papel funcional importante de este gen en el hongo

Por el contrario, la secuencia parcial del gen *pgx1* no se pudo obtener en las cepas de *F. equiseti* y *F. roseum* mediante PCR con los cebadores específicos utilizados. Este hecho es apoyado por los resultados del *Southern*

blot presentados en el capítulo 3 en los que no se detecta ninguna señal de hibridación en el genoma de estos dos aislamientos al utilizar la sonda correspondiente al gen *pgx1*. La no detección de este gen podría deberse bien, a que no está presente, al menos la secuencia correspondiente al extremo amino-terminal de la proteína, en las cepas analizadas, o bien, a que la divergencia en la secuencia es muy elevada. El primer caso podría ser explicado por fenómenos de reorganizaciones cromosómicas mediadas por recombinaciones desiguales entre elementos móviles (Daviere, *et al.*, 2001). No obstante, no habría que descartar la posibilidad de la divergencia de la secuencia por una pérdida funcional antigua seguida de un acúmulo de mutaciones.

Los resultados apoyan la existencia de un alto grado de conservación de los genes de EXOPG en las cepas en las que están presentes. Teniendo en cuenta su condición de haploides, modificaciones en la funcionalidad de las proteínas podría representar una desventaja, no así en regiones no codificadoras como las regiones IGS, en donde no existiría esta presión de selección. Cambios en las secuencias podrían afectar a la funcionalidad de las proteínas y ser relevantes en la función de estos genes en procesos como la patogénesis o durante la fase saprofita del hongo. A pesar de la existencia de indicios de que genes individuales de PGs no juegan un papel esencial en los procesos de virulencia de *Fusarium* (García-Maceira, *et al.*, 2000) la actuación conjunta de todos estos genes podría conferir ventaja selectiva al hongo en condiciones naturales, por lo que, la presión de selección actuaría minimizando el número de cambios.

Por otro lado, se puede observar que en los intrones (Tabla 2.2) existe un mayor grado de variación que en las regiones codificadoras. Estas regiones podrían acumular con mayor facilidad mutaciones sin que la funcionalidad de la proteína se viera afectada. Aun así, el corto tamaño de los intrones, típico de hongos filamentosos, y la presencia de secuencias implicadas en el procesamiento podría ser la causa de que en algunos casos la similitud sea elevada. Asimismo, estos análisis reflejan que el grado de variabilidad obtenido

entre los distintos aislamientos es distinto para cada uno de los intrones, hecho que también se ha observado cuando se realizó un análisis similar con los intrones del gen *pg1* (Posada, *et al.*, 2000).

En conclusión podríamos sugerir que existe variabilidad genética entre distintos aislamientos del género *Fusarium* si bien, las secuencias parciales de aminoácidos correspondientes a los extremos amino-terminales de PGX1 y PGX2 tienen un alto grado de conservación en los aislamientos en los que dichos genes están presentes. Este hecho también se observó en el caso de PG1 cuya región correspondiente al extremo carboxi-terminal estaba muy conservada en distintos aislamientos del género *Fusarium* (Posada, *et al.*, 2000). Aunque no habría que descartar la posibilidad de que entre distintos aislamientos de *Fusarium*, existieran cambios en regiones de estas EXOPGs no introducidas en el análisis, los resultados de nuestro análisis estarían sugiriendo que su papel sería relevante para el hongo en condiciones naturales.

Comparación de secuencias con otras poligalacturonasas descritas.

El análisis comparativo de ENDOPG y EXOPG fúngicas realizado ha revelado su distribución en dos grupos monofiléticos (Figura 2.4). Este hecho sugiere que se produjo una divergencia de estas enzimas en función del modo de acción en algún momento de su historia evolutiva anterior a la diversificación de las especies de hongos filamentosos.

Dentro del grupo que forman todas las ENDOPGs pertenecientes a hongos, se observa que no se mantienen los cinco grupos monofiléticos descritos Wubben, *et al.* (1999), distribuyéndose las PGs del grupo V (PG1 y PG5 de FOL y PGR de *C. carbonum*) en distintas ramas. Este hecho, está de acuerdo con el análisis más amplio realizado por Markovic y Janecek, (2001) en el que las ENDOPGs PG1 de FOL y PGR de *F. moniliforme* se sitúan en una rama distinta a las correspondientes al grupo V descrito por Wubben, *et al.*

(1999). Sin embargo las relaciones de las ENDOPGs pertenecientes a los otros cuatro grupos propuestos por Wubben, *et al.* (1999) coinciden con las obtenidas en este trabajo. Aunque las ENDOPGs se distribuyan en varios grupos posiblemente monofiléticos, el resultado obtenido indica que podrían divergir a partir dos genes existentes antes de la diversificación de las especies, ya que, como se puede apreciar en la figura 2.4 existen dos grandes grupos claramente separados de ENDOPGs.

Con respecto a las ENDOPGs de FORL se puede observar que la PG2 presenta una mayor proximidad a las demás secuencias obtenidas en otras especies de hongos filamentosos, mientras que, no aparecen representantes que no sean del género *Fusarium* con homología a la PG1 de FORL. Este hecho podría deberse a que los genes de las PGs distribuidas en aquel grupo han sido obtenidas utilizando sondas heterólogas lo que podría alterar la variabilidad y la representatividad real. No habría que descartar por tanto, la presencia de homólogos de este gen en otros géneros.

En el caso de las EXOPGs, la PGX2 de FORL y la EXOPG de *A. nidulans* forman un grupo monofilético que está claramente separado de las otras secuencias de EXOPGs caracterizadas hasta la fecha. La introducción en los análisis de nuevas secuencias de EXOPGs obtenidas a partir de la proteína purificada, podría contribuir a que se incremente el número de grupos monofiléticos. Por ello, la caracterización de nuevos genes codificadores de PGs es importante para entender mejor sus relaciones evolutivas.

Las PGs de plantas están distribuidas en un tercer grupo más próximo a las ENDOPGs fúngicas. En otros análisis las PGs de plantas aparecen también separadas de ambos grupos de PGs fúngicas (Markovic y Janecek, 2001) aunque más cercanas a las EXOPGs. A pesar de que las PGs de plantas comparten algún residuo que está presente en las EXOPGs fúngicas (Federici, *et al.*, 2001), los análisis apoyan la existencia de una gran divergencia entre las PGs de ambos organismos. Se ha observado que las PGs de plantas presentan una gran variabilidad (Markovic y Janecek, 2001), posiblemente

relacionada con las diferentes funciones que presentan. La gran variabilidad de estas PGs puede afectar a los resultados en un análisis comparativo si se utiliza un número pequeño de secuencias y en función de las secuencias de PGs de plantas seleccionadas. Además se ha observado que las PGs de plantas no se dividen según su modo de acción si no que se distribuyen en clados (Torki, *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de dos grupos de PGs divididos en función de su modo de acción. También es posible observar que se forman dos grupos esenciales de ENDOPGs y dos de EXOPGs lo que sugeriría la presencia de cuatro tipos esenciales de PGs representados en diversas especies que están presentes en *Fusarium*.

Capítulo 3

Control genético de las PGs de FORL

INTRODUCCIÓN.

La importancia de las poligalacturonasas en microorganismos patógenos ha llevado a la caracterización de nuevos genes en diferentes especies de hongos y se ha comprobado que existe una gran variabilidad en la organización de estos genes entre las distintas especies. Se han descrito desde familias de genes de poligalacturonasas (Williams, *et al.*, 2002; Wubben, *et al.*, 1999), hasta la existencia de diversos genes que codifican para PGs pero que no pertenecen a una misma familia como es el caso de *F. oxysporum* o *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig, *et al.*, 1998). Esta gran diversidad en la organización genética de estas proteínas hace difícil determinar que tipo de control genético existe en cada especie concreta.

Las evidencias disponibles indican que la regulación de estos genes ocurre a nivel transcripcional y presenta algunos mecanismos comunes a todos. Se ha observado que la mayoría están inducidos por sustrato y sometidos a represión catabólica (Annis y Goodwin, 1997). Estudios recientes aportan nuevos datos sobre los mecanismos de regulación de las PGs. Se ha observado que algunas PGs presentan una expresión constitutiva (Parenicova, *et al.*, 2000) detectándose sus transcritos en cultivos *in vitro* en diversas fuentes de carbono. Se han descrito algunos genes de enzimas pécticas en los que sólo se detecta su expresión en planta infectada, tal es el caso de la pectato liasa *peID* de *F. solani* (Guo, *et al.*, 1996). En otras especies como *B. cinerea* se ha observado que los genes pertenecientes a una misma familia de ENDOPGs presentan un patrón diferencial de expresión en función del tejido del hospedador, el estado de la infección y la temperatura (ten Have, *et al.*, 2001).

Dentro del género *Fusarium*, los genes de ENDOPG *pg1*, *pg5* y la EXOPG *pgx4* de FOL parecen también estar inducidos por pectina y ácido galacturónico y reprimidos por glucosa (Di Pietro y Roncero, 1998; Garcia-Maceira, *et al.*, 2001; Garcia-Maceira, *et al.*, 2000). En FORL se observó que los genes *pg1* y *pgx2* también estaban regulados a nivel transcripcional y, que

en las condiciones utilizadas para realizar los cultivos, se expresaban en los mismos momentos, aunque la *pgx2* presentaba una mayor inducción (Posada, 1999). Asimismo, se observó que ambos estaban en copia única dentro del genoma de FORL.

La caracterización de nuevos genes codificadores de PGs nos ha permitido realizar un estudio comparativo de sus estructuras descritas en el capítulo anterior. Como hemos visto, aunque en FORL la similitud entre estos genes es baja, existe una redundancia en la función y pese a que su estructura terciaria teórica presenta una gran similitud, existen algunas diferencias que se deducen de las estructuras primarias de cada PG. Esto nos llevo a preguntarnos sobre el tipo de control genético al que podrían estar sometidos estos genes y si existían diferencias a ese nivel.

En este capítulo se describe el análisis de la expresión genética de los cuatro genes codificadores de PGs descritos en el capítulo anterior en relación a diferentes sustratos a lo largo de 10 días de cultivo *in vitro* para determinar si presentan una regulación coordinada o si por el contrario, cada uno de ellos tiene un patrón de expresión particular.

Asimismo, se determinó el número de copias en el que se encontraban los genes *pgx1* y *pg2* en el genoma de FORL y en una muestra de aislamientos representativa de las secciones del género *Fusarium*, aspecto que aún no se conocía.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico y cultivo.

Para la realización de este trabajo se han utilizado los aislamientos FORL r6 y FORL r2, el aislamiento de FOL 1a (aislados de plantas de tomate infectadas y cedidos por el Dr. Tello del INIA, Madrid) y aislamientos de *F. equiseti*, *F. episphaeria*, *F. roseum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum*

aislados de piñones de piñas cerradas de *Pinus pinea* y cedidos por la Dra. Muñoz del Departamento de Zoología, Enfermedades y Plagas Vegetales de la Escuela Universitaria de Ingenieros Técnicos Forestales de La Universidad Politécnica de Madrid y un aislamiento de *F. graminearum* cedido por la Dra. M.J. Martínez del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC). El mantenimiento de cepas se describe en material y métodos del capítulo primero.

El medio de cultivo utilizado (Cruickshank, 1983) contenía como fuentes de carbono glucosa 1% para los ensayos con DNA y glucosa (1%), ácido galacturónico (1%) y pectina de manzana (1%) para los ensayos con RNA. Todos los cultivos en medio líquido se inocularon con discos miceliales de 1cm de diámetro cortados de los márgenes de colonias de 7 días.

Para la obtención del DNA las diferentes cepas fueron cultivadas en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo líquido con glucosa e incubadas a 25°C en estático durante 7 días.

Para los ensayos con RNA se inocularon 20 ml de medio con glucosa con discos miceliales de FORL r6 y se incubaron durante 4 días a 25 °C en estático, el micelio se recogió por filtración y se lavó con agua destilada estéril y fue transferido a matraces con 20 ml de nuevo medio con diferentes fuentes de carbono glucosa (1%), ácido galacturónico (1%) y pectina de manzana (1%), se cultivaron en estático a 25 °C , se recogieron a las 24 h, 36 h y al cabo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días por filtración a través de papel Whatman No. 1 y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C.

Extracción de ácidos nucleicos.

La extracción de DNA se realizó según el método descrito en el capítulo primero. La extracción de RNA total se realizó según una modificación del método Logemann, *et al.* (1987). 2 g de micelio congelado fueron homogeneizados en mortero con nitrógeno líquido. El polvo fue transferido a un

tubo de 50 ml con 5 ml de tampón de guanidinio (hidrocloruro de guanidinio 8,0 M; ácido 4-mofolinetansulfónico 20 mM; EDTA 20 mM y β -mercaptoetanol 50 mM a pH 7,0). La mezcla fue homogenizada en vórtex y se le añadieron 5 ml de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (PCIA; 25:24:1). Se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 45 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió PCIA, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Este paso se repitió dos o tres veces hasta ver limpia la fase acuosa. Se recuperó la fase acuosa en tubos y se mezcló con 0,7 volúmenes de etanol 100% frío y 0,2 volúmenes de ácido acético para precipitar el RNA y dejar el DNA y las proteínas residuales en el sobrenadante. La mezcla fue incubada a –80 °C durante 1 hora. Se realizó una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El RNA precipitado fue lavado con 1,5 ml de acetato sódico 3,0 M a pH 5,2 resuspendiéndolo suavemente. El RNA fue transferido a tubos de 1,5 ml. Se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos. En los casos necesarios se repitió el lavado con acetato sódico. Finalmente, el RNA fue lavado con etanol 70 % a temperatura ambiente y secado al vacío. El RNA fue resuspendido en 100 μ l de agua miliQ, estéril y libre de RNAsa.

La concentración de RNA fue estimada por absorción a 260 nm, asumiendo que una concentración de 40 μ g/ml es una unidad de densidad óptica. La integridad del DNA fue comprobada en geles de agarosa como se describe más adelante. Como ya se ha mencionado previamente, todas las soluciones y el agua utilizadas fueron tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC) durante 24 horas a 37 °C y luego esterilizadas a 121 °C durante 15 minutos en autoclave.

Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa en las condiciones ya especificadas en el capítulo primero.

La separación del RNA se realizó básicamente según Sambrook, *et al.* (1989) en geles de agarosa al 1,5% con formaldehído 2,2 M, tampón MAE 1X

(20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico y 1 mM EDTA, pH 8,0). A las muestras de RNA se les agregó 3,2 volúmenes de tampón MAE 5X, 1,75 vol de formaldehído y 5 vol de formamida. Las muestras se incubaron a 65 °C durante 15 minutos y enfriadas en hielo. A continuación, se les agregó 2 µl del tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25% y cianol xilano 0,25%). Para realizar los geles que posteriormente iban a ser transferidos se cargaron 15 µg de RNA total en cada carril sin bromuro de etidio. Se añadió 1 µl de una solución de bromuro de etidio 1mg/ml a las muestras para analizar su calidad únicamente en aquellos geles que no iban a ser transferidos a membrana para su hibridación. Los geles se corrieron en tampón MAE a voltaje constante de 70 V.

Digestiones con enzimas de restricción.

El DNA genómico (20-25 µg) de FORL r6 y r2 y FOL, *F. equiseti*, *F. episphaeria*, *F. roseum*, *F. moniliforme* Sheldon, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* y tomate fue digerido con las enzimas de restricción *Pst* I y *Eco*R I según está descrito por Sambrook, *et al.* (1989).

Hibridación tipo Southern.

La transferencias de los geles de agarosa con las muestras de DNA fueron realizadas según se describe en el capítulo primero. Las membranas con el DNA digerido fueron prehibridadas e hibridadas a 40 °C según Sambrook, *et al.* (1989), en las condiciones descritas en el capítulo primero en condiciones moderadamente restrictivas y con las sondas de genes *pgx1* y *pg2*

La detección se llevó a cabo mediante la exposición durante 4 y 12 horas del filtro hibridado con la película Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Gran Brentaña) a -80°C en oscuridad.

Hibridaciones tipo northern.

Las transferencias de geles de RNA se realizaron por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences, Gran Brentaña) con una solución 20XSSC (NaCl 3,0 M y acetato sódico 0,3 M pH 7,0) durante una noche tras lavar el gel durante 5 minutos con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Una vez retirado el gel, la membrana fue lavada en una solución 2XSSC y secada al aire durante 30 minutos. El RNA fue fijado a la membrana a 80 °C durante 2 horas.

Las membranas se prehibridaron a 40 °C durante una noche en una solución de formamida 50%, SSPE 5% (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM y EDTA 5 mM a pH 7,7), Denhardt 5% (Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02% y albúmina de suero bovino 0,02%), SDS 0,5% y 500 µg de esperma de salmón desnaturalizado.

Las hibridaciones se llevaron a cabo a 40 °C durante 24 horas en una solución idéntica a la anterior con las sondas de los genes *pgx1* (637 pb), *pgx2* (750 pb), *pg1* (753 pb) y *pg2* (682 pb) marcadas y desnaturalizadas según se ha mencionado previamente.

Se realizaron 2 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en SSPE 2X y SDS 0,1%, 1 lavado de 15 minutos a 55 °C en SSPE 2X y SDS 0,1% y 1 lavado de 15 minutos a 55 °C en SSPE 0,1X y SDS 0,1%.

La detección se llevó a cabo mediante la exposición durante 4 y 12 horas del filtro hibridado con la película Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Gran Brentaña) a -80 °C en oscuridad.

RESULTADOS.

Determinación del número de copias de los genes *pg2* y *pgx1*.

En estudios previos realizados por Patiño, *et al.* (1997) y Posada (1999) se determinó que los genes *pg1* y *pgx2* estaban en copia única en el genoma de FORL y en diversas especies del género *Fusarium*.

En este trabajo se ha determinado el número de copias de los genes *pgx1* y *pg2* en varias cepas de especies representativas de las secciones del género *Fusarium* mediante análisis de *Southern blot* (Figura 3.1a y 3.1b, respectivamente). Para ello se digirió el DNA genómico de varias cepas de *F. oxysporum*: FORL r6 , FORL r2, FOL 1a y de otra cepa de *F. oxysporum* obtenida de piñones de *P. pinea*, y de una cepa de las especies: *F. equiseti*, *F. episphaeria*, *F. roseum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. graminearum* con dos endonucleasas de restricción. Se utilizaron las sondas obtenidas en el capítulo primero correspondientes a los gen *pg2* y *pgx1* en condiciones moderadamente restrictivas.

En la figura 3.1a se puede observar que al utilizar la sonda del gen *pgx1* sólo se detecta una sola señal de hibridación con cada endonucleasa de restricción en todos los aislamientos de *F. oxysporum*, FOL 1a, FORL r2 y FORL r6. Las bandas adicionales que aparecen en la digestión con *Pst* I del DNA genómico de FOL 1a podrían ser debidas a fragmentación mecánica del DNA. En *F. moniliforme* aparecen dos señales de hibridación al digerir su DNA con *Eco* RI esto hecho podría explicarse por la presencia de una diana *Eco* RI en la región que hibrida con la secuencia utilizada como sonda. Las bandas que aparecen al digerir su DNA con *Pst* I podrían ser el resultado de una digestión incompleta.

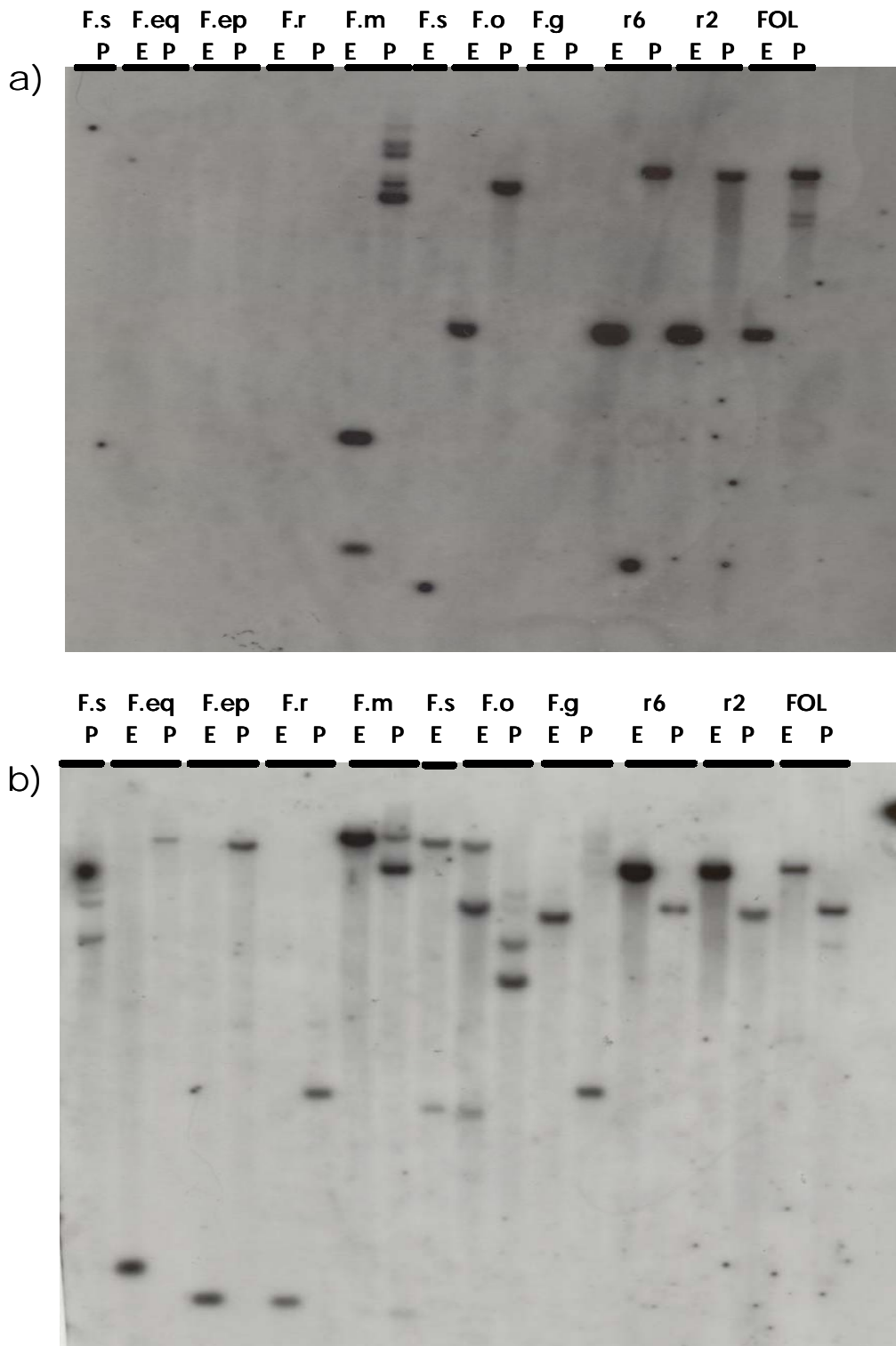


Figura 3.1: Hibridación tipo *Southern* con las sondas correspondientes a los genes *pgx1* (a) y *pg2* (b) y el DNA genómico de diferentes especies de *Fusarium* digerido con *EcoR* V (E) y *Pst* I (P): F.s: *F. solani*, F.eq: *F. equiseti*, F.ep: *F. episphaeria*, F.r: *F. roseum*, F.m: *F. moniliforme*, F.o: *F. oxysporum*, F.g: *F. graminearum*, r2: FORL r2, r6: FORL r6 y FOL.

Como se puede observar en la figura 3.1a no se ha detectado ninguna hibridación positiva con la sonda correspondiente a *pgx1* en el genoma de *F. solani*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. ephisphaeria*, y *F. roseum*. Se puede concluir que el gen *pgx1* está en copia única en el genoma de los aislamientos de *F. oxysporum* y *F. moniliforme* analizados.

En la figura 3.1b el gen *pg2* está presente en una única copia en todas las especies de *Fusarium* analizadas. En todos los aislamientos de *F. oxysporum* (FORL r2, FORL r6 y FOL 1a) se observa una única señal de hibridación. La presencia de bandas adicionales en alguna de las especies analizadas podrían ser debidas a la existencia de una diana *EcoRI* en la región del gen *pg2* que híbrida con la sonda utilizada. Por tanto, se podría concluir que el gen *pg2* está presente en copia única en todos los aislamientos del género *Fusarium* analizados.

Se puede observar que para las dos sondas utilizadas el patrón de hibridación en los tres aislamientos de *F. oxysporum* patógenos del tomate (FORL r2, FORL r6 y FOL) es bastante similar. En el caso de *pgx1* se puede observar que el aislamiento de *F. oxysporum* obtenido de pino también tiene un patrón de hibridación similar a los aislamientos patógenos de tomate.

Estudio de la expresión de los genes *pg1*, *pg2*, *pgx1* y *pgx2* en cultivos *in vitro*.

Los análisis de la expresión en cultivos *in vitro* de los cuatro genes de PGs de FORL r6 se realizaron mediante *northern blot*. Para ello, se utilizaron las cuatro sondas descritas en el capítulo primero y RNA de FORL r6 obtenido a partir de cultivos con glucosa, ácido poligalacturónico y pectina de manzana como fuentes de carbono a distintos tiempos durante 10 días (Figuras 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5).

En medios con glucosa no se detectó ningún tipo de banda en tres de los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1*. Cuando se utilizó la sonda correspondiente al gen *pg2* se observó una señal débil a las 24, 30 y 48 horas de un tamaño aproximado de 1100 nt. Estos resultados indican que no existe ninguna expresión de los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* en medios con glucosa y niveles bajos del gen *pg2*.

Cuando se utilizó como fuente de carbono pectina de manzana se pudo apreciar la existencia de una banda correspondiente a un mRNA de 1400 nt en las muestras de los cultivos del tercer y cuarto día, cuando se utilizó la sonda del gen *pgx2*. Para el gen *pgx1*, el patrón de expresión resulta parecido, pero no idéntico al del gen *pgx2*, apreciándose una señal correspondiente a un mRNA de aproximadamente 1400 nt, en las muestras recogidas desde el tercero al octavo día de cultivo. Asimismo, la intensidad de la señal varía con respecto al gen *pgx2*. Se detecta expresión del gen *pg2* en medios con pectina de manzana durante los primeros 4 días del cultivo sin embargo no se ha detectado expresión del gen *pg1* en este medio.

En medios con ácido galacturónico se detecta la expresión de ambos genes de EXOPGs desde el día tercero al sexto, siendo mayor la intensidad de la señal del gen *pgx2*. También se detectó una leve expresión del gen *pg1* el día tercero de los cultivos de ácido galacturónico. Se observó expresión del gen *pg2*, durante los primeros 4 días en los cultivos que llevaban como fuente de carbono ácido galacturónico.

Estos resultados indican que estos genes están regulados transcripcionalmente y son inducidos en presencia de sustrato.

En las figuras 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 se puede observar que el patrón de expresión de los cuatro genes en medios inductores es diferente cuantitativa y cualitativamente, así como que la inducción del gen *pg2* es sustituida en el tiempo por la de los genes de EXOPGs.

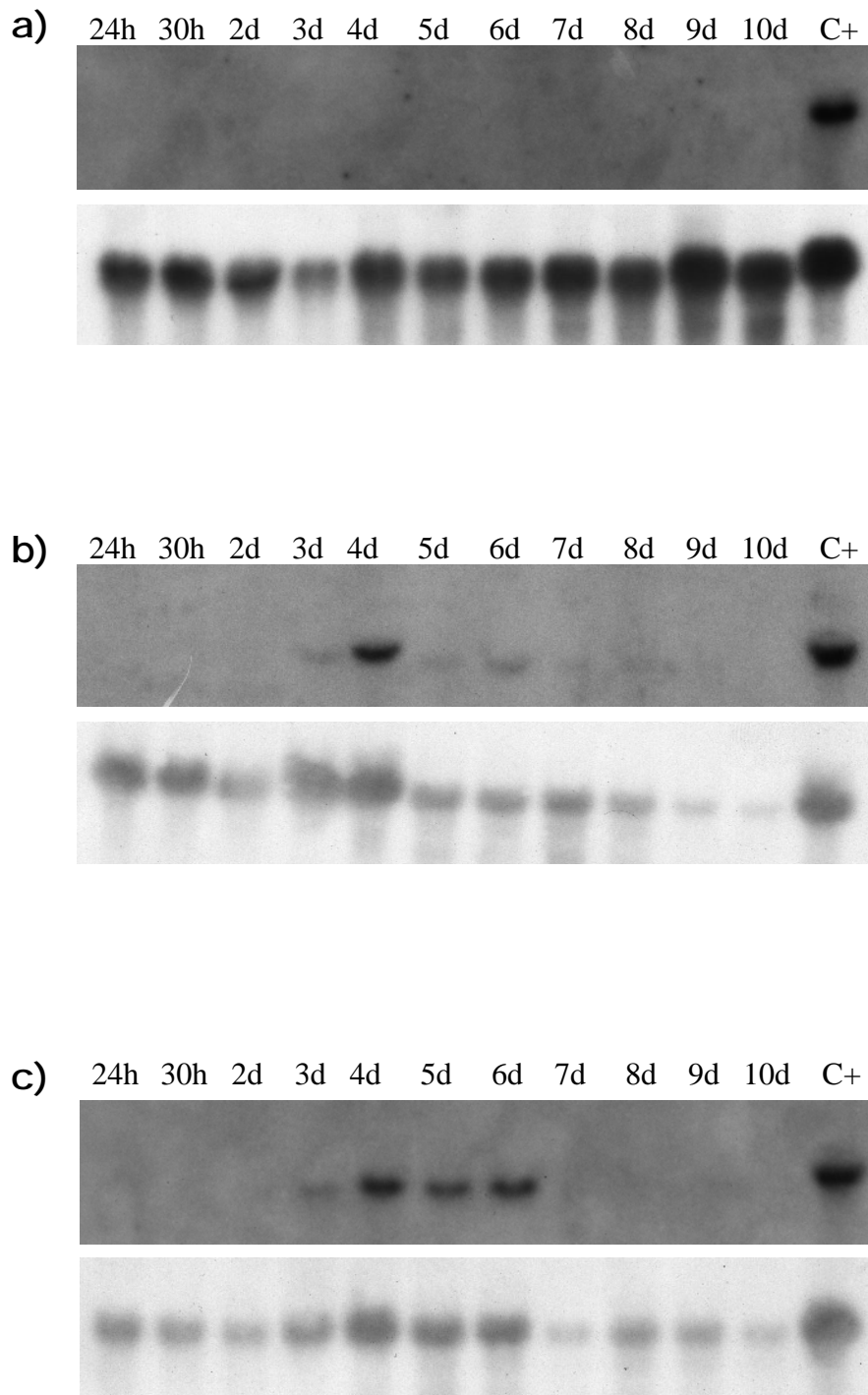


Figura 3.2: Análisis de *northern blot* con la sonda correspondiente al gen *pgx1*. Muestras recogidas desde 24 horas a 10 días de cultivos con glucosa(a), pectina de manzana (b) y ácido galacturónico (c) como fuente de carbono.

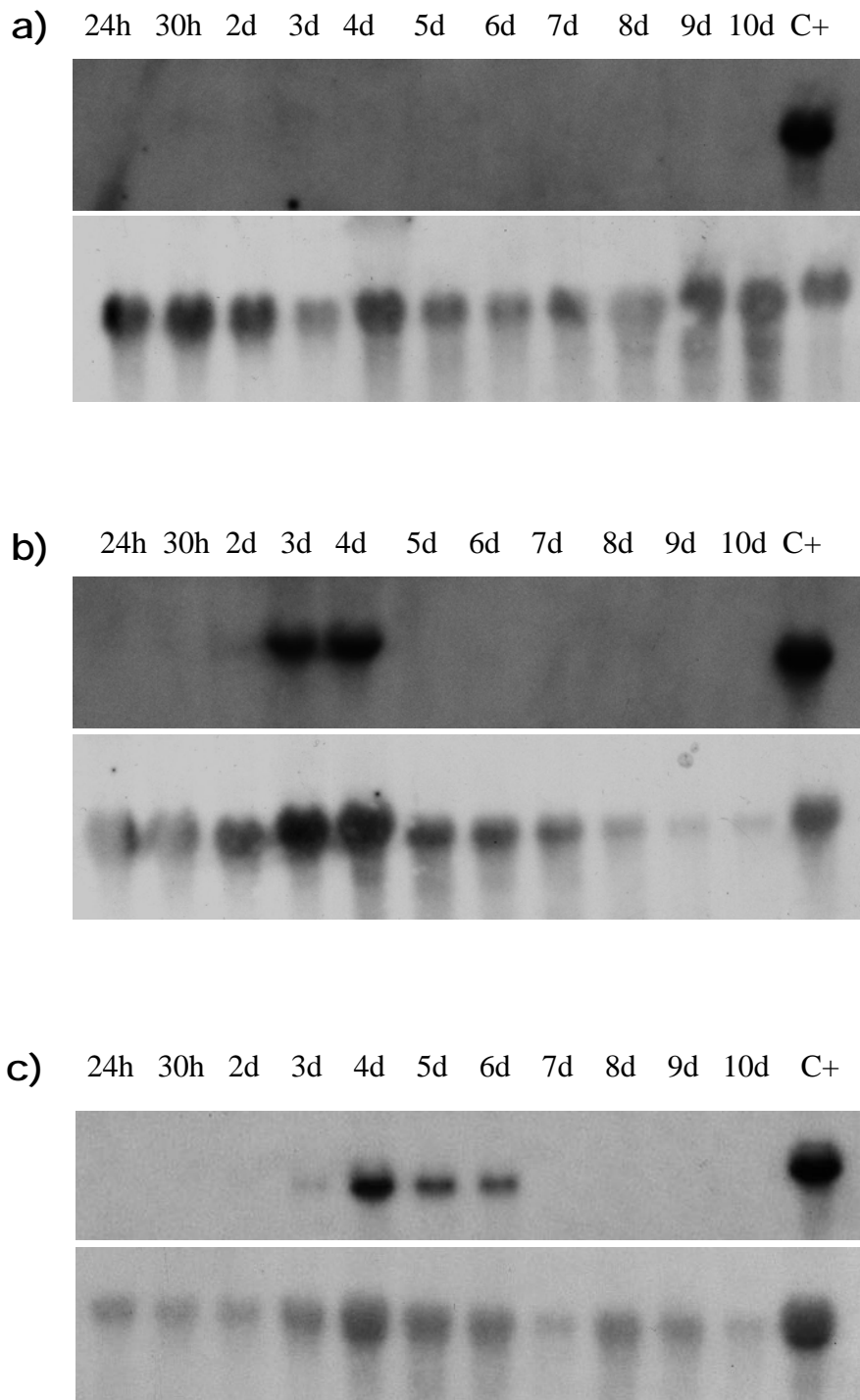


Figura 3.3: Análisis de *northern blot* con la sonda correspondiente al gen *pgx2*. Muestras recogidas desde 24 horas a 10 días de cultivos con glucosa(a), pectina de manzana (b) y ácido galacturónico (c) como fuente de carbono.

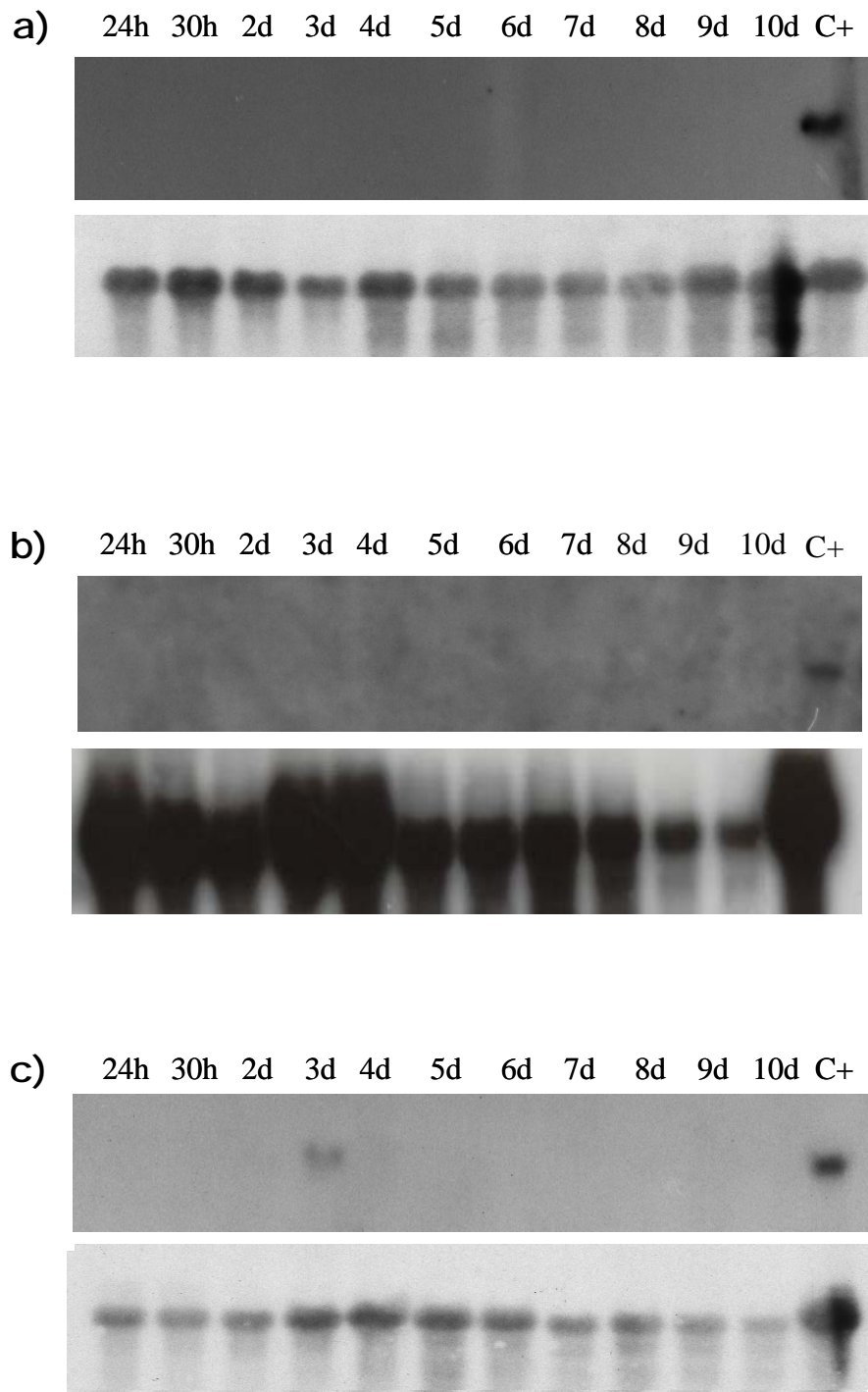


Figura 3.4: Análisis de *northern blot* con la sonda correspondiente al gen *pg1*. Muestras recogidas desde 24 horas a 10 días de cultivos con glucosa(a), pectina de manzana (b) y ácido galacturónico (c) como fuente de carbono.

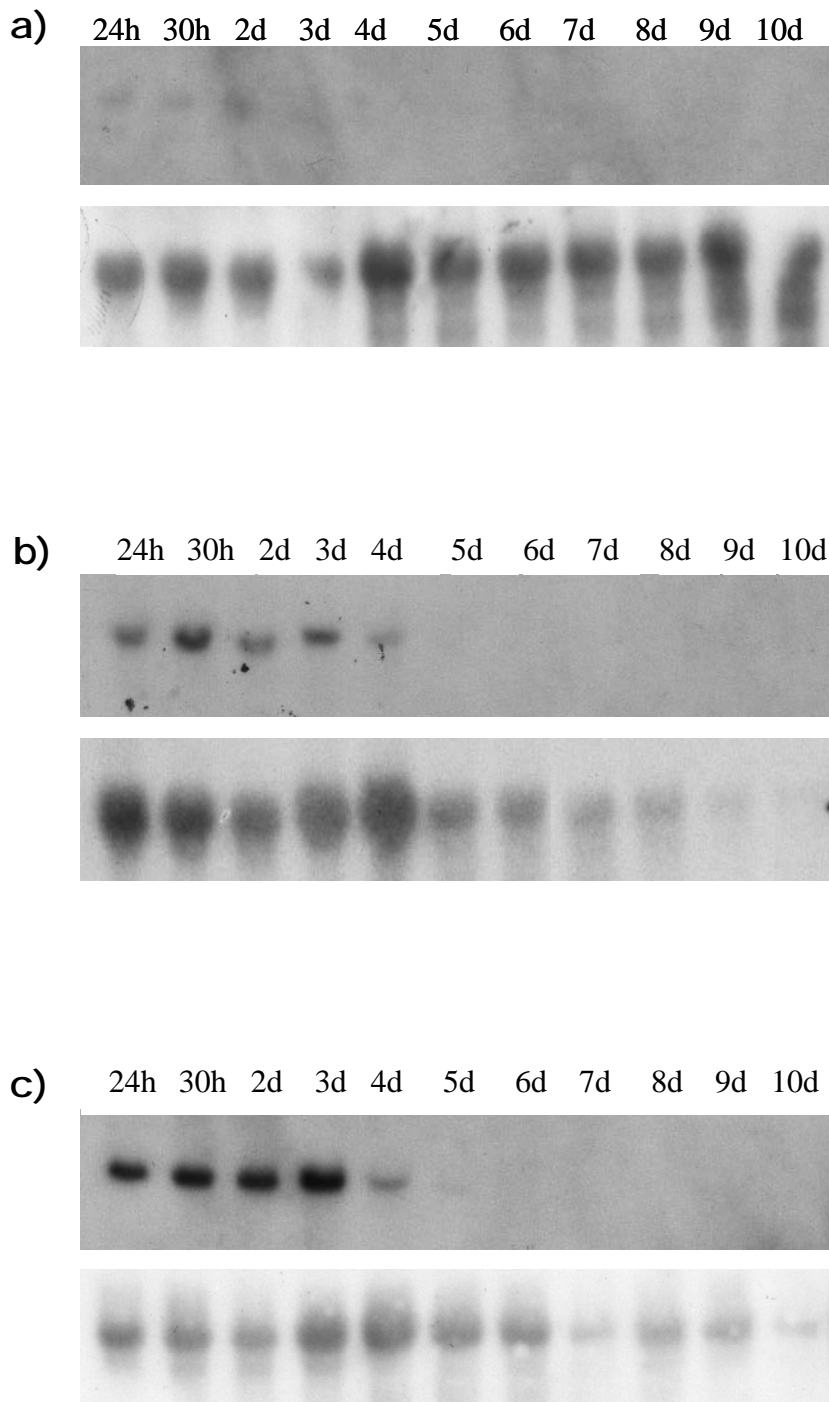


Figura 3.5: Análisis de *northern blot* con la sonda correspondiente al gen *pg2*. Muestras recogidas desde 24 horas a 10 días de cultivos con glucosa(a), pectina de manzana (b) y ácido galacturónico (c) como fuente de carbono.

También existen diferencias cualitativas y cuantitativas en función de la fuente carbonada cuando se produce la inducción de los genes. Los genes *pgx1* y *pgx2* presentan niveles más elevados que el gen *pg2*. Se observa que la inducción es más prolongada en ácido galacturónico para el gen *pgx2*, pero es más intensa en pectina manzana. Para el gen *pgx1* la inducción es más intensa en galacturónico pero se prolonga más en pectina de manzana. El gen *pg2* se induce más en galacturónico y para el *pg1* sólo se ha detectado inducción en galacturónico.

DISCUSIÓN.

Determinación del número de copias de los genes *pg2* y *pgx1*.

Los genes *pgx1* y *pg2* están presentes en copia única en el genoma de las cepas de *F. oxysporum* patógenas del tomate (FORL r2 y r6, y FOL 1a) y presentan un patrón idéntico en todas ellas (Figura 3.1), hecho que también se ha observado para los genes *pg1* y *pgx2*. Esto podría ser un indicativo de la proximidad genética entre aislamientos patógenos. En la otra cepa de *F. oxysporum* analizada obtenida de pinos los genes *pgx1* y *pg2* se encuentran en copia única, lo mismo que ocurre en el caso de los genes *pg1* y *pgx2* (Posada, 1999). Sin embargo, se ha observado que en el caso del aislamiento de *F. oxysporum* obtenido de pino sólo se mantiene un patrón de hibridación similar para el gen *pgx1*. Esto podría estar indicando que este aislamiento está más alejado de los aislamientos de *F. oxysporum* patógenos del tomate.

Con relación al gen *pgx1* y al conjunto de las cepas de *Fusarium* analizadas se observó que sólo en el caso de *F. moniliforme* Sheldon hubo hibridación positiva (Figura 3.1a). En el resto de los aislamientos analizados no se ha detectado la presencia de este gen. Esto puede ser debido a que no exista en el genoma de estos hongos ningún gen con suficiente homología a la región de *pgx1* utilizada como sonda. En el caso de *F. graminearum* y gracias a la reciente secuenciación de su genoma, se ha podido observar la presencia de

una proteína con una identidad del 66% a la región del gen *pgx1* utilizada como sonda. Por tanto, es posible que el gen *pgx1* esté presente en algunos de los aislamientos de *F. graminearum* pero la homología en esa zona fue probablemente insuficiente en el aislamiento utilizado. También podría haber perdido funcionalidad por acumulación de mutaciones o haber desaparecido. Cambios drásticos en la secuencias de algunos genes podían deberse a la existencia de elementos móviles activos en el genoma de *Fusarium* (Daviere, *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha descrito en un aislamiento de FOL la presencia del gen *pgx4* (Garcia-Maceira, *et al.*, 2000) cuya similitud con la región utilizada como sonda del gen *pgx1* de FORL es del 99.2%, aunque, como ya se mencionó en el capítulo 1, la región correspondiente con el extremo carboxi-terminal presenta cambios significativos entre ambos genes. El hecho de que en el aislamiento de FOL utilizado en nuestro trabajo solo aparezca banda al hibridar con la sonda de *pgx1* podría deberse a que este aislamiento presenta las dos copias del gen (*pgx4* y *pgx1*) situadas en *tandem*, o bien, sólo está presente en el aislamiento utilizado en este trabajo uno de los dos genes.

El gen *pg2* sin embargo está presente en copia única en todos los aislamientos de *Fusarium* (Figura 3.1b).

En resumen, los cuatro genes descritos en FORL estarían en copia única en FORL, FOL, *F. oxysporum* y las otras especies de *Fusarium* excepto *pgx1* que podría haberse perdido o presentar más diferencias en los aislamientos de *F. solani*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. ephisphaeria*, y *F. roseum*.

Por otro lado, no se ha observado que ninguno de los cuatro genes produzcan hibridación cruzada en ninguno de los aislamientos. Esto, unido a la baja similitud obtenida entre sus secuencias (Capítulo 1) parece indicar que estos cuatro genes no pertenecen a una misma familia. Como ya hemos mencionado previamente en algunas especies de hongos se han descrito familias génicas de PGs (Wubben, *et al.*, 1999; Williams, *et al.*, 2002). Sin embargo en otras especies de hongos sólo han sido descritos uno o varios

genes codificadores de PGs que están presentes en una única copia dentro del genoma, sin formar parte de la misma familia. Tal es el caso de la ENDOPG (Scott-Craig, *et al.*, 1990) y EXOPG (Scott-Craig, *et al.*, 1998) descritas en *Cochliobolus carbonum*, la EXOPG de *A. tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996) o las dos ENDOPGs de *Colletotrichum lindemuthianum* (Centis, *et al.*, 1997).

Como hemos visto, los genes de PG se encuentran en copia única en el genoma de estas especies. A pesar de la existencia en todos los casos de más de un gen de PG, este hecho no puede explicar la variabilidad en isoformas de PGs presentes en muchos de los aislamientos analizados (Posada, *et al.*, 2001). Esto podría deberse a la existencia de modificaciones post-traduccionales como la glicosilación (Caprari, *et al.*, 1993a) o la presencia de más genes de PGs que no presenten suficiente homología con los ya caracterizados. Aunque no se puede descartar la presencia de genes de PG adicionales, en el caso de *F. graminearum*, no se han encontrado evidencias que lo apoyen, ya que, las secuencias de los cuatro genes de PGs descritos en FORL presentan homología sólo con cuatro secuencias diferentes del genoma de *F. graminearum* secuenciado y disponible en la dirección <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>.

Estudio de la expresión de los genes *pg1*, *pg2*, *pgx1* y *pgx2* en cultivos *in vitro*.

Los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg1* no se expresan en presencia de glucosa (Figuras 3.2, 3.3 y 3.4). Esto podría explicarse a que están sometidos a represión catabólica hecho que se ha observado en diversas especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y en *C. carbonum* (Annis y Goodwin, 1997). La presencia en sus promotores de motivos CREA (Kulmburg, *et al.*, 1993) implicados en la represión catabólica parece apoyar esta hipótesis (Capítulo 4).

Los medios con pectina y ácido galacturónico inducen la expresión de los genes *pgx1*, *pgx2* y *pg2* aunque con diferencias cualitativas y cuantitativas (Figuras 3.2, 3.3 y 3.4). Estos datos apoyan la hipótesis de que los genes de

PGs generalmente están regulados a nivel transcripcional y son inducidos mediante sustrato (Annis y Goodwin, 1997). Ambos genes codificadores de EXOPG se inducen de modo semejante en pectina y ácido galacturónico, aunque con diferencias en función del sustrato. El gen *pgx2* parece inducirse más y en el caso de pectina de manzana su inducción comienza horas antes que el *pgx1*.

En el caso del gen *pg2* se expresa tanto en pectina como en galacturónico aunque también con diferente intensidad en galacturónico. En estos casos la inducción es más temprana, observándose señal del día primero al cuarto de cultivo, para posteriormente desaparecer. Además es el único gen en el que se ha detectado expresión en medios con glucosa (el primer y segundo día), por lo que podría ser un buen candidato a funcionar en los primeros estadios de la infección, ya que, su patrón de expresión en los primeros momentos del cultivo podría asemejarse a uno constitutivo. En los análisis filogenéticos realizados en el capítulo 2, la PG2 aparece situada cerca de la ENDOPG de *F. moniliforme* (PGR). En el estudio realizado por Wubben, *et al.* (1999) se observa que PGR está en el mismo grupo que la ENDOPG BcPG3 de *B. cinerea* cuya expresión se ha observado en medios con glucosa. Aunque no habría que descartar la existencia de expresión el resto de los días y que no haya podido ser detectada mediante *northern blot*, también es posible que este gen presente un patrón de expresión diferente en respuesta a determinados factores inductores. Se ha observado que el gen de ENDOPG *clpg2* de *Colletotrichum lindemuthianum* se expresa en estados tempranos de germinación de los conidios y durante la formación del apresorio (Dumas, *et al.*, 1999).

En el caso del gen *pg1*, los resultados de estos experimentos indican un nivel bajo de expresión en las condiciones utilizadas. En un trabajo anterior (Posada, 1999) se observó que su patrón de expresión se asemejaba al de *pgx2* y sus niveles eran mayores que los obtenidos en este estudio. Esta aparente contradicción entre ambos estudios podría explicarse teniendo en cuenta que las condiciones de los cultivos fueron diferentes. En cualquier caso

la contribución de este gen en relación al conjunto de genes de PGs parece ser escasa en FORL.

Los datos indican una inducción inicial de *pg2*, seguido de los dos genes de EXOPGs *pgx1* y sobre todo *pgx2*, que reemplazarían la actividad del gen *pg2* (Figuras 3.2, 3.3 y 3.5). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los genes de PGs de FORL están sometidos a una regulación diferencial. Esto podría tener una gran importancia en la interacción huésped-patógeno ya que la inducción de EXOPGs podría degradar los oligogalacturónicos liberados por las ENDOPGs y que van a ser los causantes del desencadenamiento de las respuestas de defensa de la planta (De Lorenzo y Ferrari, 2002). Es por ello que una estricta regulación de estos genes podría resultar de gran importancia en el proceso de patogénesis. Por otra parte, podrían existir también diferencias entre cepas o especies distintas lo que explicaría por ejemplo cómo en FORL la actividad PG mayoritaria es de tipo “exo” mientras que en FOL (en algunos de los aislamientos descritos) es de tipo “endo”.

No hay que olvidar que existen otras enzimas pécticas (pectin y pectato liasas) también presentes en FORL que pueden contribuir a la degradación de la pectina y cuyo papel aún no se conoce bien. La redundancia en *Fusarium* es sólo aparente, ya que, todas las PGs parecen diferir en su estructura primaria y posiblemente en sus características físico-químicas o patrón de inducción en planta infectada o durante el crecimiento saprofítico. El hecho de la existencia de varios genes de funciones similares regulados de manera diferencial podría conferir al patógeno una mayor flexibilidad para hacer frente a las condiciones cambiantes del ambiente del hospedador.

En conclusión, podríamos sugerir una regulación diferencial de los genes codificadores de ENDO y EXOPGs frente al sustrato y probablemente una respuesta diferente frente a otros factores que se sabe influyen sobre las PGs como señales y redes de regulación relacionadas con el desarrollo, conidiación estrés y patogénesis. La presencia diferencial de motivos reguladores en sus promotores podría apoyar esta hipótesis.

Capítulo 4

Análisis de los promotores de los cuatro genes de PGs de FORL

INTRODUCCIÓN.

El estudio de elementos reguladores de las poligalacturonasas ha despertado un gran interés en los últimos tiempos. En vista de los escasos resultados positivos que relacionan a genes individuales de PGs con la patogénesis y virulencia (ten Have, *et al.*, 1998; Oeser, *et al.*, 2002), y dado que, en la mayoría de los casos existe una redundancia de estas enzimas, el descubrimiento de factores que estén implicados en su regulación podría resultar de gran utilidad para entender el papel que desempeñan en este proceso.

Como hemos visto, estas enzimas están reguladas a nivel transcripcional y presentan mecanismos de regulación generales como la inducción por sustrato y represión catabólica. Aunque, en la mayoría de los casos descritos exista más de un gen codificador de PG, y por tanto, una redundancia en función que permitiría una mayor eficacia en la degradación de la pectina, la poca relación existente entre las secuencias de estos genes en muchas de las especies, indica una divergencia antigua. Este hecho sugiere una divergencia también a nivel de motivos reguladores y por tanto en la regulación de los diferentes genes de PGs de un mismo organismo.

En general, las evidencias parecen apoyar esta idea ya que, cuando se ha caracterizado más de un gen en la misma especie, se ha visto que los patrones de regulación tanto en cultivos *in vitro* (Wubben, *et al.*, 1999) como en planta infectada (ten Have, *et al.*, 2001) de cada uno de los genes suelen presentar diferencias. Como hemos visto en el capítulo anterior los genes de PGs en FORL presentan una regulación diferencial y parecen actuar secuencialmente dependiendo de las condiciones.

Estudios recientes indican que la regulación de estos genes es más compleja de lo que antes se creía y que no sólo depende del sustrato. Parece que otro factor que estaría influyendo en la regulación transcripcional de las PGs sería el pH del medio. Este hecho se ha observado, por ejemplo en los

casos de *B. cinerea* (Wubben, *et al.*, 2000) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Cotton, *et al.*, 2003). También se ha observado que el factor PacC implicado en la regulación de los genes en función de las condiciones de pH del medio (Denison, 2000) está relacionado con la virulencia y la expresión de genes de PGs en *F. oxysporum* (Caracuel, *et al.*, 2003).

Otros factores relacionados con la transducción de señales, como el sistema de MAPK quinasas, están relacionados con la regulación de genes codificadores de enzimas pécticas (Di Pietro, *et al.*, 2001). También el factor ccSNF1, necesario para la expresión de genes sometidos a represión catabólica, está relacionado con la inducción de las enzimas pécticas en *C. carbonum* (Tonukari, *et al.*, 2000). En ambos casos también se ha observado que estos factores están relacionados con la patogénesis.

Por tanto, la determinación de factores implicados en la regulación de estas enzimas es necesaria para entender su integración en las redes de regulación y su implicación en los procesos de patogénesis.

Por ello, nos planteamos un doble objetivo en este capítulo. Primero determinar que factores podrían estar implicados en la regulación de las PGs de FORL y segundo, establecer un sistema, que nos permitiera realizar un análisis funcional comparativo de las cuatro regiones promotoras de una forma rápida, ya que, como se ha comentado la transformación de *Fusarium* es un proceso largo y laborioso.

Para alcanzar el primer objetivo se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes de PG de FORL utilizando el servidor TRANSFAC (Wingender, *et al.*, 2000) donde existen herramientas como el programa MatInspector (Quandt, *et al.*, 1995) que permiten detectar motivos reguladores potenciales comparando las secuencias introducidas con matrices de sitios de unión a factores de transcripción, especialmente aquellos en los que se demostró su capacidad de unión experimentalmente.

Posteriormente para el análisis funcional de los promotores, se eligió el sistema de *S. cerevisiae*, ya que la transformación de esta levadura es un proceso sencillo. Por otro lado, se han descrito PGs en cepas de *S. cerevisiae* y se ha observado que presentan inducción por sustrato (Gognies, *et al.*, 2001) y se había demostrado que promotores de genes de *A nidulans* son activados en *S. cerevisiae* (Andrianopoulos y Timberlake, 1994).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Análisis de secuencias promotoras.

Mediante el servidor TRANSFAC disponible en la pagina web www.transfac.gbf.de (Wingender, *et al.*, 2000) se utilizó el programa MatInspector (Quandt, *et al.*, 1995) para detectar posibles motivos implicados en la regulación.

Material biológico.

Para la realización de este trabajo se ha utilizado la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MAT α , *ura3*- Δ , *trp1*-4, cedida amablemente por el Dr. A. Belarbi de la Universidad de Reims, Francia. Los clones de levaduras han sido mantenidas mediante resiembras periódicas en placas petri con medio de cultivo YPG (extracto de levadura 1%, bactotripton 1% y glucosa 1%) incubadas a 28 °C durante siete días y posteriormente conservado a 4 °C. También se guardaron todos los clones a -80 °C en medio YPG líquido con glicerol al 16%.

Para la realización de las construcciones se utilizó el vector *Yep357* cedido amablemente por el Dr. Bertrand Daignan Fornier de la Universidad de Bordeaux II, Francia.

Medios y condiciones de cultivo.

Todos los clones de *S. cerevisiae* fueron cultivados a 28 °C en condiciones estáticas en el caso de medios sólidos y a 150 rpm en caso de medios líquidos. Se utilizó 20 ml de medio YPG para el crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* MAT α , *ura3*- Δ , *trp1-4*. El medio utilizado para la selección de los transformantes fue YNB sin aminoácidos (DIFCO, USA) con glucosa al 2%, bacto agar al 1.8% y triptófano al 0,002%. Para los ensayos de actividad se utilizaron matraces de 100 ml con 20 ml de YNB con aminoácidos (DIFCO, USA) suplementado con 0,5 % y 1% de glucosa, ácido galacturónico, ácido poligalacturónico y pectina manzana y combinaciones de glucosa al 0,5% con ácido galacturónico, ácido poligalacturónico y pectina de manzana al 0,5 y 1%.

Medida del crecimiento.

El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia de 1 ml de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm restando el valor a la misma longitud de onda del medio utilizado.

Obtención de vectores.

Se diseñaron distintas parejas de cebadores para las secuencias promotoras de genes codificadores de poligalacturonasas en los que se introdujeron las dianas de restricción *BamH* I y *Xba* I en los extremos 5' de cada cebador. Las secuencias cebadoras diseñadas aparecen en la tabla 5. Todos los oligonucleótidos de los cebadores 2R contenían 9 nucleótidos correspondientes a los tres primeros codones de cada uno de los genes (subrayados), con el fin de fusionar el marco de lectura de los genes de PG con el del gen *LacZ*.

Para realizar las amplificaciones se utilizaron 500 ng de DNA plasmídico de los clones genómicos de *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2*, como molde. Se utilizó el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) con el siguiente programa: un paso previo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 58 °C

(anillamiento) y 2 minutos a 72 ° C (extensión). Por último, un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C y parada a 4 °C. Se utilizó la polimerasa de copia de alta fidelidad Pwo (ROCHE Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Gen	Oligo	producto	amplificación	Vector
<i>pgx1</i>	Pgx1prom 1F	5'-GCAT GGATCC AAT TCT CTC ATG CAA TCA AGT T-3'	631 pb	Yeppgx1
	Pgx1prom 2R	5'- ACTA TCTAGA <u>GAA CAA CAT</u> GTT GA TTCT CGA -3'		
<i>pgx2</i>	Pgx2prom 1F	5'- GCAT GGATCC TCT CGC ATGA TG TCC GTC C-3'	668 pb	Yeppgx2
	Pgx2prom 2R	5'- ACTA TCTAGA <u>GAC CTT CAT</u> TGT GAA AAG ATT -3'		
<i>pg2</i>	Pg2prom 1F	5'- GCAT GGATCC TCA ACG TTA ACT TAG TAA AGT C-3'	724 pb	Yeppg2
	Pg2prom 2R	5'- ACTA TCTAGA <u>AGA GAA CAT</u> GTT AAT GAA TGG A-3		
<i>pg1</i>	Pg1prom 1F	5'- GCAT GGATCC GCT GCA GAA ATG TAT TCG ATT A -3'	1538 pb	Yeppg1a
	Pg1prom 2R	5'- ACTA TCTAGA <u>TCG AAC CAT</u> TGT GAT ATT CGA -3'		
<i>pg1</i>	Pg1prom 3F	5'- GCAT GGATCC AGG GAA TCA ATT AAG GGA TAA AT-3	724 pb	Yeppg1b
	Pg1prom 2R	5'- ACTA TCTAGA <u>TCG AAC CAT</u> TGT GAT ATT CGA -3'		

Tabla 4.1: Oligonucleótidos utilizados para realizar las construcciones de los vectores Yeppg1a, Yeppg1b, Yeppg2, Yeppgx1 y Yeppgx2. Se indica asimismo el tamaño de los productos de amplificación.

Los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Las bandas del tamaño deseado (Tabla 4.1) se cortaron y el DNA se extrajo con el kit High Pure PCR product purification kit (ROCHE Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se digirieron 400 ng de cada uno de los productos de amplificación y del vector *Yep357* con 8 unidades de *BamH I* y *Xba I* durante 3 horas a 37 °C en un volumen total de 25 µl. Posteriormente se purificó el DNA digerido con el kit High Pure PCR product purification kit (ROCHE Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se hizo una mezcla de ligamiento con 10 ng de cada uno de los fragmentos amplificados y digeridos, 10ng del vector *Yep357* y con la enzima T4 ligasa (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) según Sambrook, *et al.*

(1989) en un volumen total de 10 µl. Se transformó la cepa DH5α de *E.coli* con cada una de las mezclas de ligamiento según Sambrook, *et al.* (1989).

La selección de transformantes positivos se realizó mediante PCR directamente sobre las colonias crecidas en medio selectivo. Para ello, se picaron diez colonias de cada una de las transformaciones realizadas con las distintas construcciones y se pasaron a nuevas placas con medio selectivo antes de introducirlas en la mezcla de amplificación. Se utilizaron los cebadores específicos para cada gen y la enzima Ecotaq (Ecogen, España) con el mismo programa utilizado sobre el DNA de los clones genómicos exceptuando el número de ciclos, que en este caso fueron 30. Se obtuvieron diversos clones para cada pareja de cebadores cuyo producto de amplificación coincidía en tamaño con la longitud esperada en base a la localización de los cebadores en cada secuencia promotora correspondiente a *pgx1*, *pgx2*, *pg1* y *pg2*.

Se eligió un clon positivo para cada una de las amplificaciones y se cultivó en 20 ml de LBA líquido durante 18 horas a 37 °C y 225 rpm para la extracción de DNA plasmídico. Para ello se utilizó el kit de purificación de plásmidos (Boehringer Mannheim, USA) según las especificaciones del fabricante.

Se obtuvieron así los plásmidos Yeppg1a, Yeppg1b, Yeppg2, Yeppgx1 y Yeppgx2 que tenían fusionados fragmentos de las regiones promotoras de 1538 pb (Yeppg1a) y 724 pb (Yeppg1b) del gen *pg1*, de 724 pb de *pg2*, de 631 pb de *pgx1* y 668 pb de *pgx2*, respectivamente, con el gen *Lac Z* (Figura 4.1).

Para comprobar que las secuencias de cada uno de los promotores no tenían ninguna modificación producto de la PCR y estaban en fase con el gen informador los fragmentos clonados fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid con el secuenciador de DNA ABI-PRISM (Applied Biosystems, USA) según las indicaciones del fabricante.

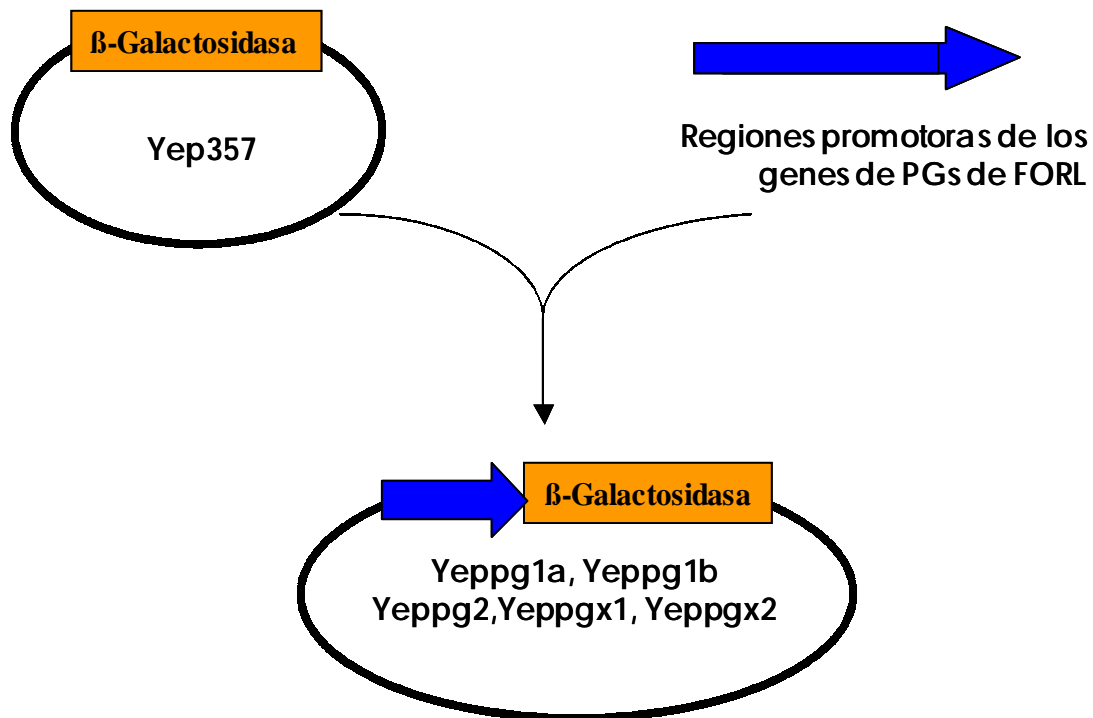


Figura 4.1: Representación esquemática de la fusión de las secuencias correspondientes a las regiones promotoras de los genes de PGs de FORL, con el gen de la β -galactosidasa del plásmido Yep357.

Transformación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* $mat\alpha$, $ura3-\Delta$, $trp1-4$.

La transformación de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo de Eble, (1992). Para ello, se cultivó en medio YPG (extracto de levadura 1%, bacto triptona 1% y glucosa 1%) la cepa de *S. cerevisiae* $MAT\alpha$, $ura3-\Delta$, $trp1-4$ durante dos días a 28°C y 150 rpm. Se tomaron 3 ml del cultivo y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. Después se eliminó el sobrenadante dejando sólo el precipitado. Se mezclaron 2 μ g de cada uno de los vectores con las secuencias promotoras y 1 μ g de DNA de esperma de arenque (GIBCO, Gran Bretaña) que fue utilizado como DNA transportador en un volumen de 20 μ l. A continuación, se mezclaron las soluciones de DNA con los precipitados de *S. cerevisiae*. Posteriormente, se añadió 1 ml de solución de polietilenglicol 4000 45% y acetato de Litio 1M a cada una de las muestras y se dejaron durante dos días a temperatura ambiente. Se sembraron 100 μ l de cada transformación en placas con el medio selectivo (YNB sin aminoácidos

con glucosa al 2%, bacto agar al 1.8% y triptófano al 0,002%) y se cultivaron durante una semana en las condiciones descritas.

La selección de transformantes positivos se realizó mediante PCR tal y como se detalla para la selección de bacterias transformantes. Se guardaron los clones en glicerol al 16% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras inocularlos en medio YPG y cultivarlos a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm durante toda la noche .

Obtención de muestras para los ensayos de β -galactosidasa.

Se seleccionó una cepa transformada por cada uno de los transformantes obtenidos de cada construcción (Yeppg1a, Yeppg1b, Yeppg2, Yeppgx1 y Yeppgx2). Se inocularon en medio YPG a partir de colonias crecidas en placa y se cultivaron de 12 a 14 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm. Se determinó el crecimiento y se ajustó la concentración de células diluyendo los cultivos con YPG hasta obtener una absorbancia de 1 a 600 nm de longitud de onda. Se inocularon matraces con los diferentes medios descritos anteriormente para los ensayos de actividad con 400 μl de cada uno de los cultivos de YPG y se cultivaron en agitación a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recogieron muestras de 1,5 ml cada uno de los cultivos a las 6 , 12 , 24 y 36 horas. Se determinó el crecimiento y la actividad β -galactosidasa de cada una de las muestras. Se realizaron tres replicas de cada experimento.

Ensayo para la valoración de actividad β -galactosidasa.

Para determinar la actividad β -galactosidasa se utilizó el método descrito por Kippert, (1995). Se añadieron 400 μl de Buffer Z con 0.2% de sarcosyl (Na_2HPO_4 60mM, NaH_2PO_4 40mM, KCl 10mM, Mg_2SO_4 1mM, β -Mercaptoetanol 50 mM, Sarcosyl 0.2%) a 200 μl de cada una de las muestras y se incubó 30 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después añadiendo 150 μl de una solución de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG 4mg/ml) en Fosfato Sódico 0,1 M pH 7,5 y se agitó la mezcla vigorosamente. La reacción se detuvo con 400 μl de 1,5 M Na_2CO_3 . Se

centrifugó la mezcla 30 segundos a 16000 g y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 420 nm. La actividad β -galactosidasa se expresa como la relación entre la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm y el crecimiento celular estimado como la densidad óptica a 600 nm.

RESULTADOS.

Análisis de las regiones promotoras de los cuatro genes codificadores de poligalacturonasas de FORL.

Los clones genómicos de los cuatro genes de PGs de FORL contenían regiones aguas arriba de diferente longitud. Se obtuvo una región de 631 pb para el gen *pgx1*, 668 pb para el gen *pgx2*, 1538 pb para *pg1* y 2352 pb para *pg2*. Con el fin de determinar la similitud de las regiones promotoras de estos cuatro genes, los primeros 631 nucleótidos antes del codon de inicio de cada gen fueron alineados mediante el método CLUSTAL (PAM250) con el programa MegAlign (Lasegener, USA) y se observó que el porcentaje de similitud entre ellas oscilaba entre el 19,2 y 22,5%.

Para detectar secuencias consenso relacionadas con la regulación de los genes de PGs se analizaron las secuencias aguas arriba no codificadoras de los cuatro genes mediante la base de datos TRANSFAC (Wingender, *et al.*, 2000). Estas regiones comprenderían la mayoría de los elementos reguladores dado que por su tamaño podrían considerarse suficientes para controlar la expresión de dichos genes (Herbert, *et al.*, 2002). Además la secuencia completa del promotor de gen *pg2* presenta en su extremo 5' homología con un gen de función desconocida de *Neurospora crassa* y con una propionato hidroxilasa de *E.coli*. Esto podría ser un indicio de que esta secuencia contenía toda la región situada entre dos genes.

Como se puede observar en la figura 4.2, existen una serie de motivos relacionados con la regulación de genes de hongos y levaduras que están presentes en los promotores de los cuatro genes de PGs de FORL. Estos

motivos y sus secuencias consenso así como las referencias donde se han descrito se pueden observar en la tabla 4.2.









	Secuencias consenso	Referencia
CREA 	5´- G/CYGGGG-3´	Kulmburg <i>et al.</i> , 1993
GATA 	5´- TATCTA-3´	Fu and Marzluf, 1990
Heat Shock 	5´-NGAAN-3´	Fernandes <i>et al.</i> , 1994
STRE 	5´- AGGGGG-3´	Schuller <i>et al.</i> , 1994
PacC 	5´-GCCARG-3´	Espeso <i>et al.</i> , 1997
StupAp 	5´-A/TCGCGT/ANA/C-3´	Dutton <i>et al.</i> , 1997
Aba/Tec1p 	5´-CATTCY-3´	Adrianopoulos y Timberlake, 1994 Madhani y Fink, 1998b
Ste12p 	5´- TGAAACA-3´	Madhani y Fink, 1998b

Tabla 4.2: Secuencias consenso de los motivos presentes en los promotores de las PGs de FORL y referencias en donde han sido descritos.

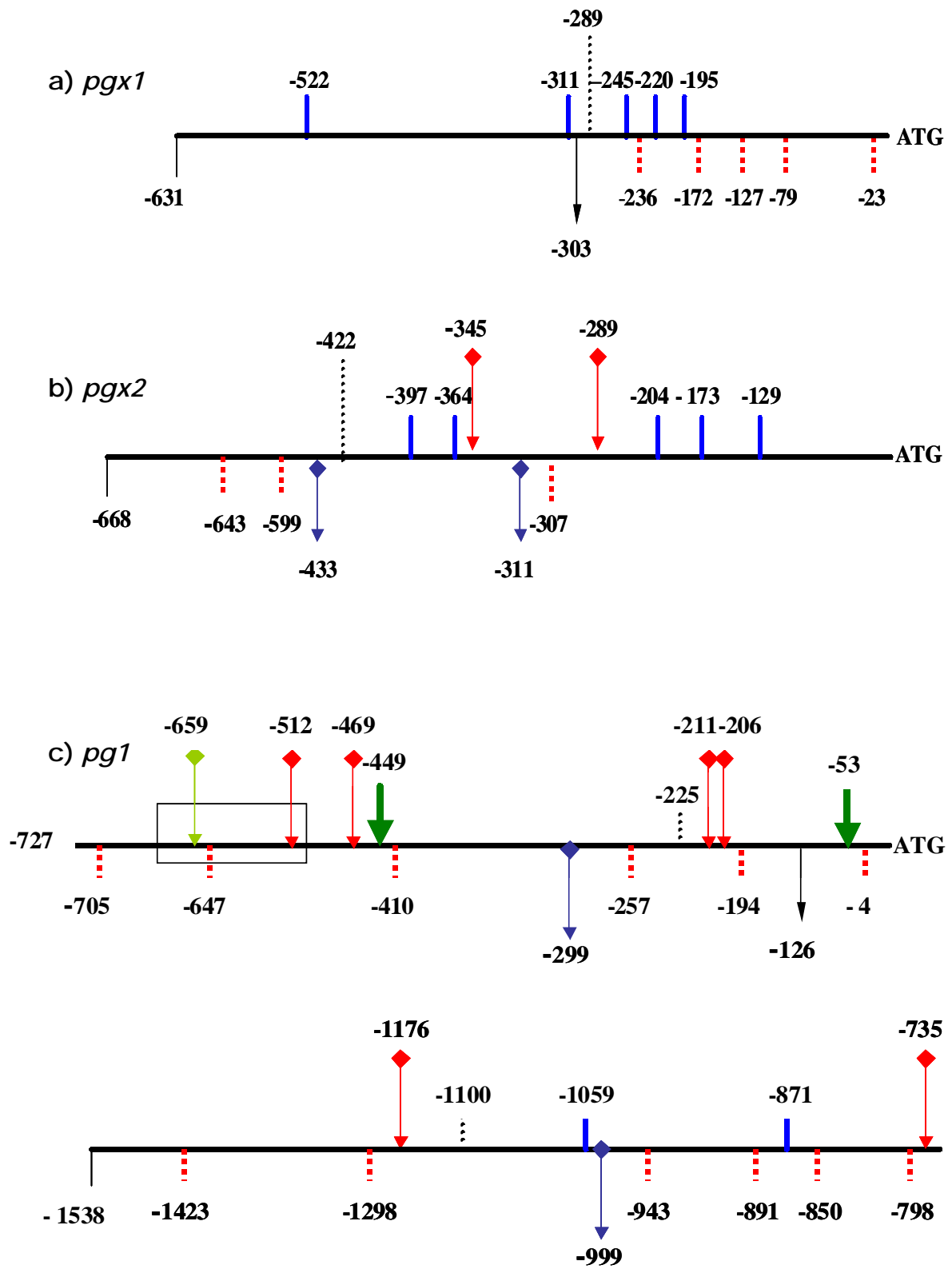
Se observa la presencia de motivos CREA (Kulmburg, *et al.*, 1993) y los motivos GATA (Fu y Marzluf, 1990). Estos motivos relacionados con el metabolismo de fuentes de carbono y de nitrógeno están presentes en los promotores de los cuatro genes de PGs, pero como se observa en la figura 4.2 presentan un patrón de distribución diferente. Se puede observar la presencia de muchos más motivos CREA en las regiones promotoras de las EXOPGs, siendo su presencia mucho menos abundante en los promotores de las ENDOPGs. La presencia de los motivos GATA también presenta una distribución desigual, especialmente entre los promotores de las dos EXOPGs.

También se pueden observar la presencia en las regiones promotoras de dos tipos de motivos implicados en la inducción de genes relacionados con la

respuesta al estrés, los motivos STRE (Schuller, *et al.*, 1994) y los motivos *Heat Shock* (Fernandes, *et al.*, 1994). Los motivos *Heat Shock* también están presentes en las cuatro regiones promotoras no así los motivos STRE que no se han observado en el promotor del gen *pgx2*.

Los motivos PacC (Espeso, *et al.*, 1997) están solamente presentes en las regiones promotoras de los genes *pg1* y *pg2*.

Por último, se observa en todas las regiones promotoras de los cuatro genes de PGs de FORL la presencia de motivos relacionados con el control del desarrollo del hongo. Los motivos StupAp (Dutton, *et al.*, 1997) de *A. nidulans* (Fig 4.2) están presentes en todas las regiones promotoras excepto en la región obtenida del promotor de *pgx1*. Los motivos AbaA (Andrianopoulos y Timberlake, 1994), cuya secuencia consenso coincide con la secuencia descrita en *S. cerevisiae* de unión a factores de transcripción de la familia TEA/ATTS (Madhani y Fink, 1998b), son los motivos presentes más abundantes relacionados con el desarrollo. Su distribución también es diferente entre las cuatro regiones promotoras pero su presencia es más abundante en las ENDOPGs, no estando presentes en el promotor del gen *pgx1*. En los dos promotores de los genes de ENDOPGs estas secuencias TEA/ATTS, están situadas a 56 pb (*pg2*) y 147 (*pg1*) de la secuencia 5'-TGAAACA-3' (elementos de respuesta a feromonas ó motivos PRE) que en *S. cerevisiae* interacciona con el factor de transcripción Ste12. En *S. cerevisiae* ambos motivos están relacionados con la inducción del crecimiento de la levadura en forma filamentosa y con la patogénesis (Madhani y Fink, 1998a).



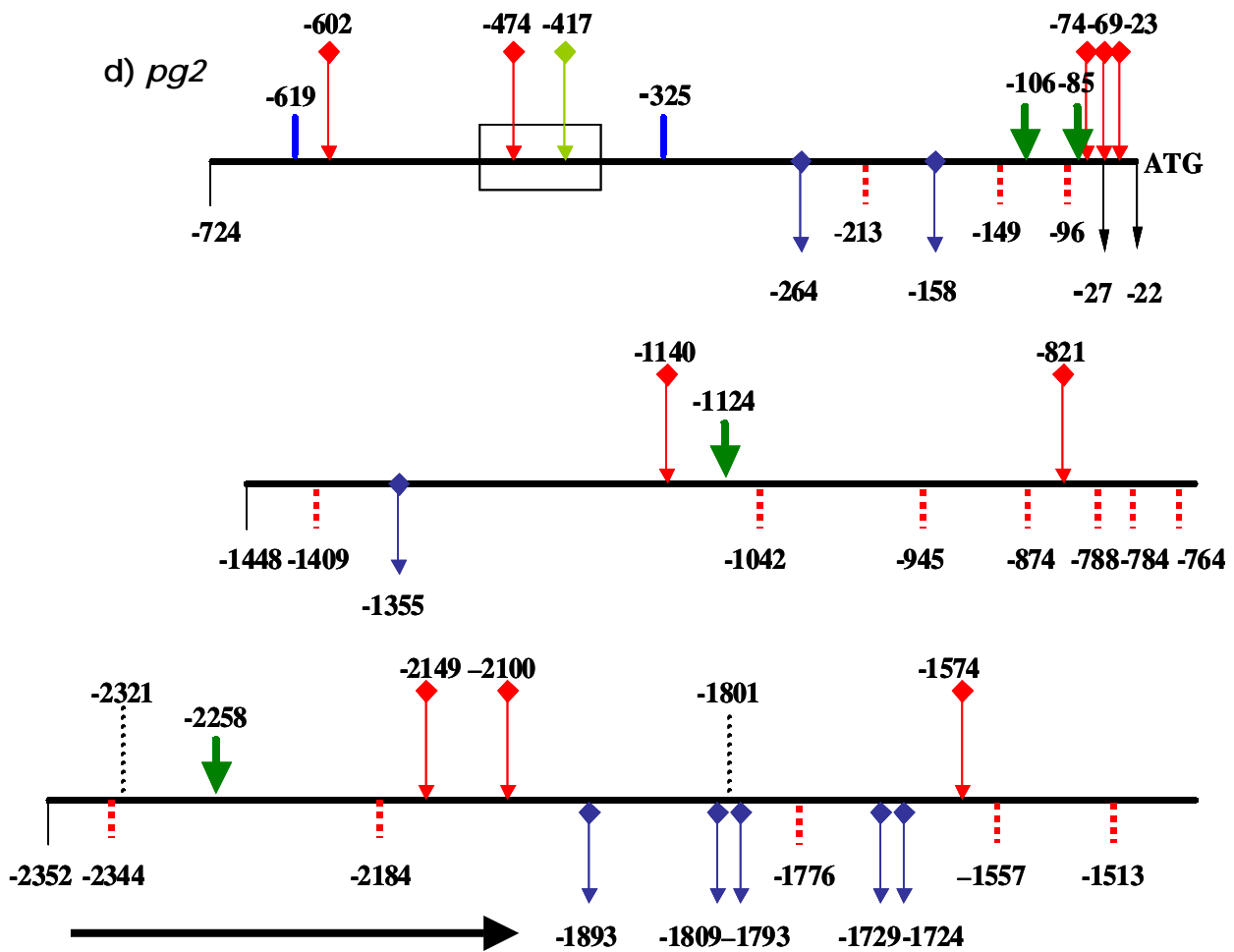


Figura 4.2: representación esquemática de las regiones promotoras de los genes *pgx1(a)*, *pgx2* (B), *pg1(c)* y *pg2* (d). Se señalan los motivos CREA en azul, GATA en rojo discontinuo, STRE negro discontinuo, Heat Shock flecha negra, de unión a StupAP flecha azul, a Aba/Tec1p flecha roja, a Ste12p flecha verde claro, y a PacC flecha verde oscuro. Con un recuadro se indica la proximidad de los motivos de unión Tec1p y Ste12p. En el promotor de *pg2* se señala con una flecha negra horizontal la región con homología a una hidrolasa de *Burholderia funqorum* (Genbank ZP_00028690)

Análisis funcional de los promotores de los genes PGs de FORL en *S. cerevisiae*.

Tras realizar un análisis *in silico* de las secuencias de las regiones promotoras de los cuatro genes de PGs de FORL, nos planteamos realizar un análisis funcional de dichas regiones. Para ello una buena forma de establecer la funcionalidad *in vivo* de estas secuencias es fusionar las secuencias promotoras con un gen informador. Nosotros utilizamos en este caso el gen *LacZ* presente en el plásmido Yep357 (Myers, *et al.*, 1986). Cuando se realiza la fusión de un promotor con este gen su actividad puede ser detectada

midiendo la actividad β -Galactosidasa en presencia de un sustrato apropiado. Esta actividad es fácilmente detectable en medios de cultivo líquidos tanto en levaduras (Kippert, 1995) como en hongos filamentosos.

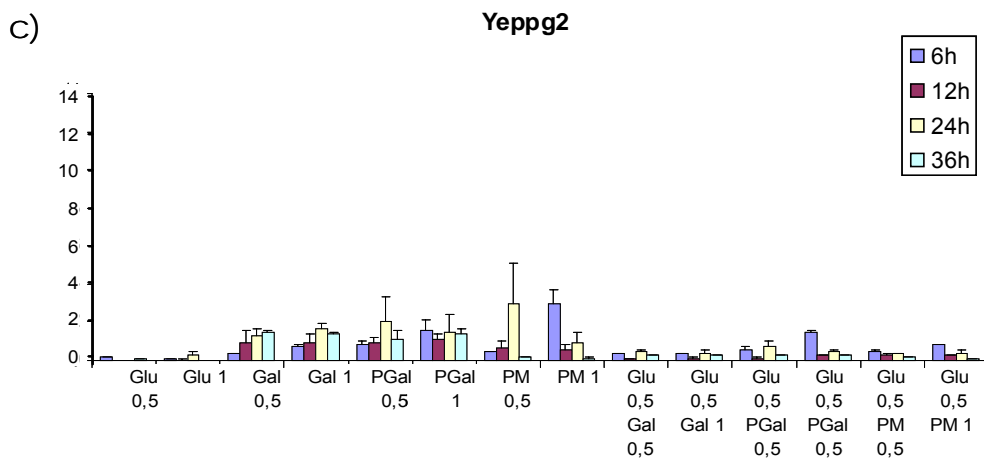
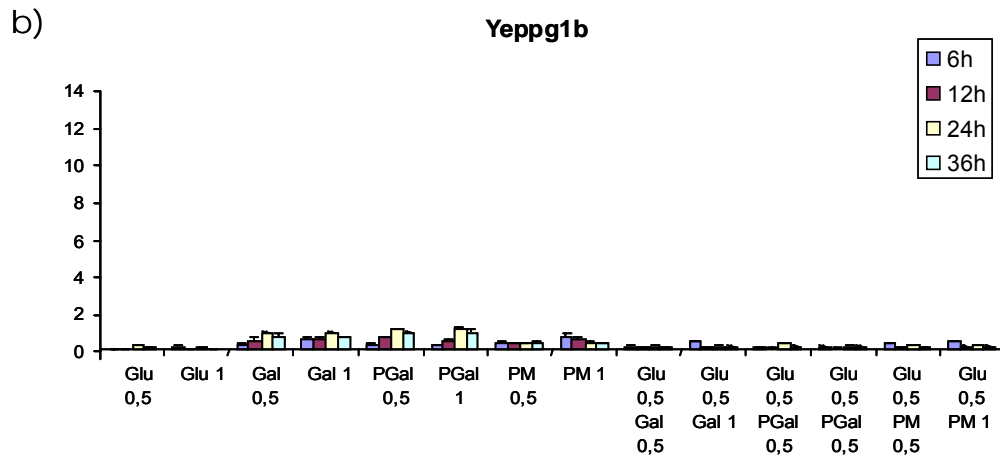
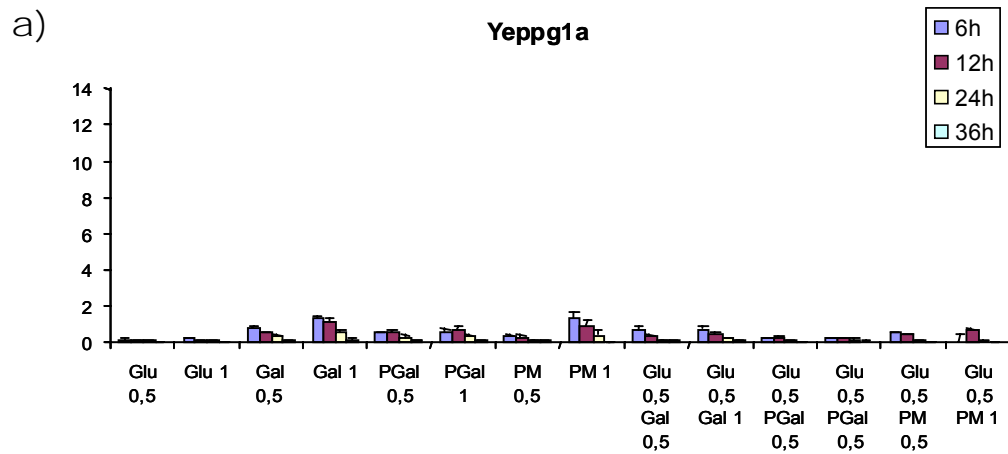
Para realizar las fusiones de los promotores con los vectores se amplificaron las regiones promotoras de los cuatro genes de PGs mediante PCR con los oligonucleótidos descritos en la tabla 4.1. Una vez obtenidas todas las construcciones se transformó *S. cerevisiae* MAT α , ura3- Δ , trp1-4, con cada uno de los plásmidos Yeppg1a, Yeppg1b, Yeppg2, Yeppgx1 y Yeppgx2 y también con Yep357 para ser utilizado como control negativo. Los clones seleccionados se cultivaron en medio YNB con diferentes fuentes de carbono: glucosa, pectina de manzana, ácido galacturónico y ácido poligalacturónico a distintas concentraciones y combinaciones de glucosa al 0,5 % con el resto de fuentes de carbono.

Los resultados de la actividad β -Galactosidasa obtenida para cada construcción en diferentes momentos de los cultivos se muestra en la figura 4.3.

Los resultados indican que los promotores de PGs de *Fusarium* logran inducir la expresión del gen de la β -Galactosidasa en *S. cerevisiae*.

EL patrón de expresión es inducible en presencia de ácido galacturónico, poligalacturónico y pectina de manzana, pero no en medios con glucosa. El carácter represor de esta fuente de carbono se comprueba con la disminución de los valores de β -Galactosidasa en los cultivos con ácido galacturónico, poligalacturónico y pectina de manzana más glucosa.

No se detectan grandes diferencias entre los cuatro promotores respecto a las fuentes carbonadas utilizadas. Sin embargo, se pueden observar pequeñas diferencias en medios con galacturónico y poligalacturónico que producen una mayor inducción que la pectina en el caso de *pgx1*, ocurriendo lo contrario en medios con pectina al 1% en el caso de los genes *pgx2* y *pg2*.



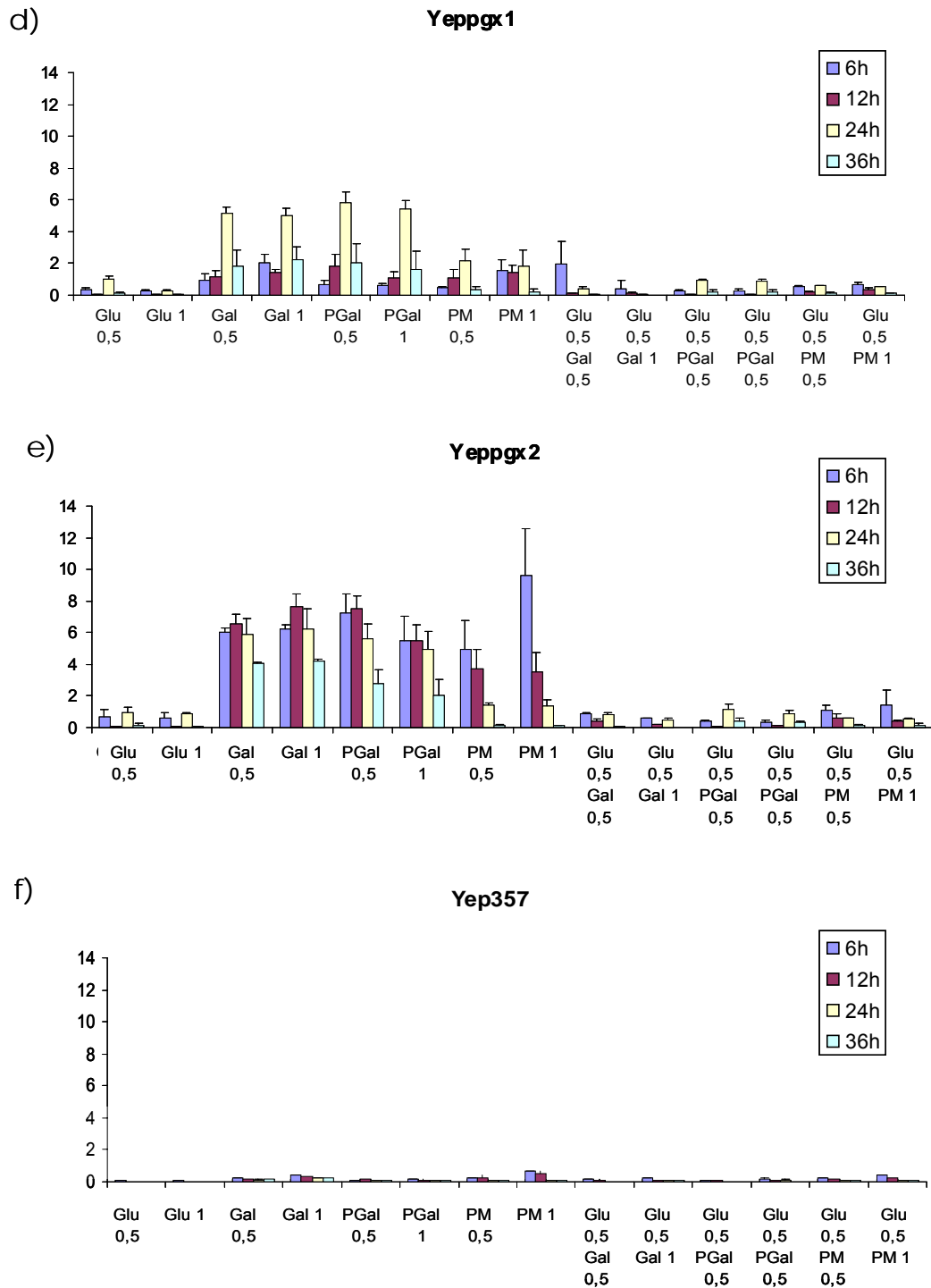


Figura 4.3: Actividad β -galactosidasa en cultivos de *S. cerevisiae* transformados con los plásmidos a) Yeppg1a, b) Yeppg1b, c) Yeppg2, d)Yeppgx1, e) Yeppgx2 y f)Yep357.

Los cuatro promotores presentan patrones de expresión cualitativa y cuantitativamente diferentes. Se puede observar que la inducción del gen de la

β -Galactosidasa por parte de los promotores de las dos EXOPGs es mayor que la que producen los dos promotores de las ENDOPGs. La inducción no sólo es mayor en el caso de *pgx2* sino que también es más rápida que en *pgx1*. En el caso del gen *pg1*, se puede observar que la actividad β -Galactosidasa es cercana al nivel de detección.

El tamaño del promotor en el caso del gen *pg1* no afecta al patrón de expresión. Se puede observar que los niveles de inducción del gen de la β -Galactosidasa son similares para la región de 1538 pb (plásmido Yeppg1a), y la región parcial de 727 pb (plásmido Yeppg1b).

DISCUSIÓN.

Análisis de las regiones promotoras de los cuatro genes codificadores de poligalacturonasas de FORL.

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior indican que la regulación de los genes codificadores de PGs en FORL se produce a nivel transcripcional (Lang y Dornenburg, 2000). Los cuatro genes caracterizados parecen estar sometidos a los mecanismos generales de inducción por sustrato y represión catabólica en las condiciones en las que se han desarrollado los cultivos *in vitro* (Annis y Goodwin, 1997). Aun así, existen indicios de que estos genes están sometidos a una regulación más compleja determinada por otros factores (Di Pietro, *et al.*, 2001; Caracuel, *et al.*, 2003).

Gracias a la obtención de regiones situadas aguas arriba de las secuencias codificadoras de los genes de PGs de FORL se pudo realizar un estudio que nos permitiera encontrar motivos de unión a proteínas que pudieran estar implicadas en la regulación. La determinación de estos motivos es de gran importancia para plantear nuevos experimentos que contribuyan a entender mejor la regulación de estos genes.

Los datos obtenidos mediante el alineamiento de los 631 nucleótidos antes del codon de inicio de cada una de las secuencias indican que estas regiones presentan una baja similitud. Al realizar un análisis de estas secuencias con el fin de detectar motivos relacionados con la regulación de cada uno de los genes se pudo observar (Figura 4.2), que la mayoría de los motivos relacionados con el metabolismo del carbono (CREA) y el nitrógeno (GATA) se conservan en las cuatro secuencias.

La regulación por fuente de carbonada se consideraba uno de los factores básicos para la inducción de PGs. La represión catabólica parece ser un mecanismo general en la regulación de enzimas relacionadas con fuentes carbonadas en organismos como *Aspergillus* (Kulmburg, *et al.*, 1993), *Botrytis* (Wubben, *et al.*, 2000), así como, *Saccharomyces* (Nehlin, *et al.*, 1991). En algunos casos se ha comprobado que esta represión catabólica está mediada por motivos reguladores de unión a proteínas CREA (Lockington, *et al.*, 2002). Por tanto, la presencia de motivos CREA en los promotores de los cuatro genes de PGs de FORL estará de acuerdo con esta función.

También los mecanismos de regulación implicados en el metabolismo del nitrógeno parecen jugar un papel importante. Se puede observar en los cuatro promotores de los genes de PGs (Figura 4.2) la presencia de motivos GATA, que se unen a la proteína AREA relacionada con el metabolismo del nitrógeno en *A. nidulans* (Marzluf, 1997). La presencia de estos motivos en los cuatro promotores hace suponer que presentan un significado biológico. Se ha descrito en levaduras que la falta de nitrógeno induce el crecimiento filamentoso (Madhani, 2000) el cual está relacionado con la virulencia (Lo, *et al.*, 1997). Estos procesos podrían compartir rutas comunes que han sido mantenidas en los hongos filamentosos. Además se ha observado que AreA, el factor de unión a motivos GATA, de *A. nidulans* tiene un importante papel en reorganizaciones de la cromatina y funciona como un co-activador transcripcional interaccionando con otros factores de transcripción (Scazzocchio, 2000). Por lo que los factores de unión a GATA podrían modular la expresión de los genes de PGs interaccionando con otro tipo de inductores.

Esto indica que la regulación de estos genes es compleja y está integrada en redes de regulación más generales que responden a señales ambientales que disparan complejos de genes adecuados a unas condiciones ambientales. Las PGs son enzimas que tienen un papel activo durante la patogénesis y estarían incluidas en respuestas frente a situaciones de estrés y patogénesis. Por otro lado, su papel durante el crecimiento saprofito implicaría la existencia de otros motivos que respondieran frente a otro tipo de situaciones. Se puede observar en la figura 4.2 que el patrón de distribución de los motivos es distinto en las cuatro regiones promotoras, esto podría estar relacionado con la especialización de estas enzimas y con el hecho de que estos genes presenten una regulación diferente con relación a su papel funcional, pudiendo estar destinadas algunas a la obtención de nutrientes durante el crecimiento saprofito mientras que otras podrían contribuir de forma decisiva durante la fase patogénica del hongo.

Se puede observar que las dos regiones promotoras de los genes de ENDOPGs presentan una mayor abundancia de motivos relacionados con el control del desarrollo como los motivos de unión a StupAP, a Aba y a Ste12p. La proteína StupAp (Stunted protein) de *A. nidulans* está implicada en la regulación del desarrollo multicelular y el inicio del ciclo reproductivo sexual, además de funcionar como un integrador de otras señales relacionadas con el desarrollo (Dutton, *et al.*, 1997), como el factor AbaA (Andrianopoulos y Timberlake, 1994) también relacionado con la formación del conidióforo en *A. nidulans*. Los motivos de unión a AbaA pertenecen a la familia de motivos TEA/ATTS (Andrianopoulos y Timberlake, 1994). En *S. cerevisiae* estos motivos se unen a la proteína Tec1p que interacciona formando un dímero con la proteína Ste12p que a su vez se une a los motivos PRE (elementos de respuesta a feromonas) (Madhani y Fink, 1998a), además se ha comprobado que el gen *pgu1* codificador de ENDOPG de *S. cerevisiae* es inducido durante los procesos de crecimiento haploide invasivo y pseudofilamentación controlados por el sistema Tec1p, Ste12p y Kss1 (Madhani, *et al.*, 1999). Este sistema complejo de motivos de regulación controlado por MAPK quinasas y por la ruta del cAMP (Madhani, *et al.*, 1999) está implicado en la activación de

la filamentación. También ha sido demostrado que en *C. lindemuthianum* existen dos motivos en el promotor del gen de ENDOPG *clpg2* necesarios para su activación transcripcional por pectina y durante el desarrollo del apresorio que presentan una alta homología con los motivos TEA y PRE de *S.cerevisiae* (Herbert, *et al.*, 2002). Este hecho apoya la hipótesis de que las PGs estén reguladas por elementos relacionados con determinados momentos del desarrollo del hongo y apoya el significado funcional de la presencia de estos motivos en los promotores de PGs.

Como se observa, la distribución de los motivos PRE de unión al factor Ste12p sólo están presentes en los promotores de las ENDOPGs. Además se sitúan cerca de motivos de unión a Tec1p. Esto podría ser importante, ya que, se ha observado expresión del gen *pg2* en los primeros momentos de cultivos *in vitro* en medios con glucosa. Un hecho similar ocurre con el *clpg2* de *C. lindemuthianum* cuya expresión, controlada por este sistema, ocurre durante los primeros estados de germinación de los conidios (Dumas, *et al.*, 1999; Herbert, *et al.*, 2002).

En la figura 4.2c y 4.2d se puede observar la presencia en los promotores de los genes *pg1* y *pg2* de motivos de unión a PacC (Denison, 2000). Este factor relacionado con la regulación de genes en función del pH del medio, está implicado en la inducción de genes en condiciones de pH alcalino, así como, en la represión de los genes que se expresan en condiciones de pH ácido. Se ha comprobado que el pH regula muchos procesos en hongos, desde enzimas como las relacionadas con el metabolismo del carbono hasta productos del metabolismo secundario como toxinas o antibióticos (Peñalva y Arst, 2002; Denison, 2000). En *A. nidulans* se ha identificado un sistema de regulación por pH que está controlado por una familia de genes (PacC, paA, B, C, F, H, e I) (Denison, 2000).

En *F. oxysporum* ha sido caracterizado recientemente el gen de la proteína PacC y se ha demostrado que la expresión de los genes de ENDOPGs *pg1* y *pg5* está controlada por este factor (Caracuel, *et al.*, 2003). La

presencia de un motivo de unión a PacC sugiere que estos genes expresados normalmente en condiciones ácidas están sometidos a represión por medio de PacC. Este hecho también ha sido demostrado en *A. nidulans* en donde PacC regula negativamente la expresión de genes inducidos por condiciones ácidas (Espeso y Arst, 2000). La ausencia de motivos PacC en los promotores de las EXOPGS no implica que estos genes no estén regulados en función del pH ambiental, ya que, se ha observado que la actividad de PGX2 depende del pH (Patiño, 1998). La presencia de estos motivos en las secuencias situadas aguas arriba de las regiones promotor secuenciadas no podría descartarse. Si bien, y a pesar de que el sistema de control por medio de PacC presenta un mecanismo similar en *Aspergillus* y *Fusarium* parece que existen algunas diferencias en los mecanismos de proteólisis y en la activación de PacC (Caracuel, *et al.*, 2003). Así mismo, se ha observado que en *S. cerevisiae* que no todos los genes expresados en condiciones alcalinas están regulados por el homólogo a PacC (Penalva y Arst, 2002), por lo que no podría descartarse la existencia de algún otro mecanismo de regulación en función del pH.

También se ha podido observar la presencia de motivos *Heat Shock* (Fernandes, *et al.*, 1994) en los cuatro promotores y motivos STRE (Schuller, *et al.*, 1994) en todos excepto en el promotor de *pgx2*. Aunque su presencia en los promotores no implica que sean funcionales se ha demostrado que una sola copia de las secuencias STRE es suficiente para producir la inducción de un gen informador (Kobayashi y McEntee, 1993). Se ha comprobado que tanto los elementos STRE como los *Heat Shock* son inducidos por déficit de nutrientes (Estruch, 2000). Este hecho podría estar relacionado con la función de las PGs durante la fase saprofita, así como, en los primeros momentos de la patogénesis. Hasta la fecha no ha sido descrito que los genes de PGs estén regulados por señales de estrés pero la presencia de estos motivos en todos los promotores puede ser una evidencia significativa de la inducción de estos genes en condiciones adversas. Las respuestas frente al estrés presentan una especial importancia en microorganismos cuyo ambiente es variable y las condiciones tanto de temperatura como de disponibilidad de nutrientes no son constantes.

No habría que descartar que los genes de PGs estuvieran regulados por otros factores relacionados con rutas de regulación generales. Se ha comprobado que la inducción de genes mediada por los elementos STRE está controlada por la ruta cAMP-PKA en donde la inhibición de la proteína quinasa A en condiciones de estrés produce la activación de las respuestas anti-estrés (Estruch, 2000; Toone y Jones, 1998). También se ha observado que la disrupción de una MAPK quinasa en *F. oxysporum* reduce la expresión de una endopeptidasa (Di Pietro, *et al.*, 2001), por lo que la regulación de genes de PGs estaría integrada en una red de regulación general mediada por el sistema MAPK quinasa.

Análisis funcional de los promotores de los genes PGs de FORL en *S. cerevisiae*.

Se ha realizado un análisis funcional de regiones promotoras de los genes de PG de FORL en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae*. Se ha podido comprobar la validez del sistema para determinar la funcionalidad de los promotores de genes de FORL, ya que se observó inducción del gen informador en el sistema de *S. cerevisiae*. Informaciones adicionales apoyaban la existencia de homologías entre motivos reguladores de PGs de hongos como *C. lindemuthianum* y *S. cerevisiae* (Herbert, *et al.*, 2002) y de una regulación similar de un gen de PG de *S. cerevisiae* a nivel transcripcional (Gognies, *et al.*, 2001).

Las regiones promotoras utilizadas parecen contener los motivos esenciales para la regulación en función de la fuente de carbono. Este sistema nos ha permitido comprobar que regiones de alrededor de 700 pb de los promotores son capaces de inducir la expresión de un gen informador. Un hecho similar ha sido demostrado con el promotor del gen de ENDOPG *clpg2* de *C. lindemuthianum* en donde una región de 668 pb es suficiente para inducir la expresión de un gen informador en el hongo (Herbert, *et al.*, 2002).

También se puede observar que el promotor del gen *pg1* no parece inducir la transcripción del gen informador de forma significativa. Por otro lado se puede observar que cuando se utilizó un fragmento mayor de la región promotora de este gen no se produjo una inducción significativamente diferente en ninguno de los casos. Este hecho también estaría de acuerdo con los resultados obtenidos mediante *northern blot* en el capítulo 3 en los cuales no se ha detectado la expresión del gen en cultivos *in vitro*, exceptuando en medio con galacturónico y también a bajos niveles.

Se observa una inducción del gen informador en medios con ácido galacturónico, ácido poligalacturónico y pectina de manzana para el resto de los genes *pg2*, *pgx1* y *pgx2*. Por el contrario, no existe expresión en presencia de glucosa. Su papel represor se confirma en los cultivos en los que además de las fuentes carbonadas se añade glucosa. Este modelo de represión catabólica por glucosa concuerda con el deducido de los experimentos de expresión de los genes de PG en cultivos *in vitro* utilizando las mismas fuentes de carbono (capítulo 3) con la excepción de *pg2* cuya expresión en medios con glucosa se detectaba en los primeros momentos de los cultivos.

Se observa inducción del gen informador con el promotor del gen *pg2* (Figura 4.3). Se ha observado que en el hongo se produce una mayor transcripción del gen en los primeros días de los cultivos *in vitro*, por lo que no habría que descartar su expresión en otros momentos teniendo en cuenta las diferencias en el ciclo celular del hongo y de la levadura. Tampoco habría que descartar que los motivos relevantes para la activación del gen informador en las condiciones del experimento se encontrasen fuera de la región que ha sido fusionada con dicho gen.

La escasa activación por parte de los promotores de las ENDOPGs hace pensar en que otros factores podrían ser más relevantes para inducir su expresión. Este hecho podría estar relacionado con la presencia en los promotores de las ENDOPGs de motivos relacionados con la regulación por pH, así como, de motivos relacionados con el desarrollo como los que se unen

a los factores Tec1p y Ste12p y cuya presencia ha sido relacionada con la inducción de ENDOPGs en *C. lindemuthianum* (Herbert, *et al.*, 2002).

Por el contrario los promotores de genes EXOPG mostraron una inducción más elevada. Como se muestra en la figura 4.3, la inducción del gen informador con los promotores de *pgx1* y *pgx2* es la que presenta valores más altos, siendo el promotor de *pgx2* el que produce la mayor inducción. Se ha observado en cultivos *in vitro* de FORL que la mayor parte de la actividad poligalacturonasa se debe al gen *pgx2* (Patiño, 1998), y que su inducción no es sólo mayor sino que es más rápida (de las Heras, *et al.*, 2003). Estos resultados obtenidos en el sistema heterólogo estarían de acuerdo con lo que ocurre en FORL (Capítulo 3). El diferente grado de inducción del gen informador por parte de estos promotores podría estar relacionado con la presencia de motivos reguladores de tipo potenciador (enhancer) que no hayan sido detectados, ya que la información que existe sobre este tipo de motivos es escasa en hongos, particularmente en *Fusarium*. No podría descartarse que algún otro motivo de los presentes pudieran producir inducción del gen informador en las condiciones del experimento, por ejemplo los motivos GATA cuya presencia en ambos promotores es bastante diferente y se han relacionado con reorganizaciones de la cromatina (Scazzocchio, 2000).

Los datos de este estudio que confirman lo observado en los análisis de expresión génica en relación con la fuente de carbono apoyan un modelo de acción diferencial de los genes y por tanto sugiere un significado funcional diferente. La redundancia de genes sería por tanto sólo parcial o aparente.

Los resultados apoyan la validez del sistema utilizado para realizar un análisis comparativo de los promotores de PGs de FORL, así como para realizar un análisis funcional de los promotores. Este sistema permitiría también realizar de una forma rápida experimentos para determinar si cada uno de los motivos presentes en los promotores tienen realmente un significado funcional.

Capítulo 5

Expresión heteróloga de PGX1 y PGX2 en *P. pastoris*

INTRODUCCIÓN.

La mayoría de la información disponible sobre PGs procede de la caracterización de las secuencias de los genes. Esta información basada en la secuencia primaria de los genes es insuficiente y a veces no predice adecuadamente las características físico-químicas de la proteína funcional. La caracterización funcional de las PGs es importante y debe de tenerse en cuenta para entender su papel en el proceso de la patogénesis y desarrollo de síntomas, así como, también en el campo aplicado de la industria alimenticia. La mayoría de los preparados que se utilizan actualmente con este fin contienen una mezcla de enzimas (Dalboge, 1997), por lo que la obtención y purificación de enzimas individuales podría ser de gran utilidad en este tipo de procesos. Por tanto, la obtención de nuevas PGs resultaría de gran importancia para comprender mejor su significado biológico, así como, por su interés comercial.

La importancia de las enzimas pécticas ha llevado a la reciente aparición de diversos estudios sobre su estructura tridimensional con el fin de obtener información acerca de sus características físico-químicas. La mayoría de las estructuras obtenidas son de pectin y pectato liasas, pero recientemente han aparecido las estructuras de algunas ENDOPGs fúngicas (Pickersgill, *et al.*, 1998; van Santen, *et al.*, 1999; Cho, *et al.*, 2001; Federici, *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha publicado hasta la fecha, la de ninguna EXOPG.

Pocas EXOPGs han sido caracterizadas en hongos filamentosos (Dos, *et al.*, 2002; Kester, *et al.*, 1996; Scott-Craig, *et al.*, 1998), habiéndose obtenido una en FORL (Patiño, 1998). La ausencia de datos se debe a la dificultad que presenta la purificación de las PGs en general y de las EXOPGs en particular.

A pesar de que las PGs son enzimas que se secretan al medio, la obtención de éstas a partir de los cultivos es un proceso largo y laborioso, complicado por la presencia de numerosas isoformas muchas veces debidas a una mezcla de distintas enzimas y por el hecho de que son proteínas

minoritarias. En el caso de FORL se ha observado la presencia de, al menos, cuatro isoformas distintas (Guevara, *et al.*, 1997) en cultivos *in vitro*, posiblemente debidas a cada uno de los cuatro genes caracterizados.

Una estrategia alternativa para obtener proteínas purificadas es la expresión de los genes correspondientes en sistemas que permitan la producción de enzimas individuales en altas cantidades. La utilización de bacterias con este fin ha supuesto problemas, en el caso de proteínas de origen eucariótico, que se han atribuido, entre otras razones, a que estas enzimas requieren modificaciones post-traduccionales como la glicosilación o la formación de puentes disulfuro (van den Hombergh, *et al.*, 1997). No obstante, una ENDOPG de *F. oxysporum* (Garcia-Maceira, *et al.*, 2001) se ha expresado en bacterias, y aunque la proteína heteróloga presentaba actividad no existen datos acerca de cómo eran sus características físico-químicas.

Las levaduras, sin embargo, han resultado ser un sistema más eficaz para la producción de proteínas eucariotas. Existen antecedentes en los que se ha observado su validez para la producción de PGs, como la ENDOPG de *F. moniliforme* cuya expresión en *S. cerevisiae* fue conseguida por Caprari, *et al.* (1996) obteniéndose una proteína con características físico-químicas similares a la de la proteína nativa.

Existen otras levaduras que han demostrado ser de gran utilidad para expresar enzimas pécticas como *Pichia pastoris*. Esta es una levadura metilotrófica capaz de metabolizar el metanol como única fuente de carbono, mediante la expresión de la alcohol oxidasa, que se induce en grandes cantidades en su presencia. Esta característica ha servido para utilizar el promotor de uno de los genes codificadores de alcohol oxidasa para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Además, se han desarrollado vectores de expresión con modificaciones que facilitan la purificación de la proteína producida. Este sistema presenta ventajas frente a *S. cerevisiae*, ya que, es más adecuado para fermentaciones a escala industrial y se puede cultivar hasta altos niveles de densidad celular en medios de cultivo

económicos (Blanco, *et al.*, 2002). Además este sistema se ha utilizado para la expresión de proteínas eucarióticas con éxito (Martinez-Ruiz, *et al.*, 1998; Martinez-Ruiz, *et al.*, 2000; Murasugi, *et al.*, 2003; Ouyang, *et al.*, 2003).

El objetivo que nos planteamos en este trabajo fue evaluar un sistema que nos permitiera la producción de las PGs de FORL, en especial de las EXOPGs, para poder realizar una caracterización enzimática.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico y plásmidos.

Para los experimentos de expresión heteróloga de los genes *pgx1* y *pgx2* de FORL, se han utilizado las cepas GS115 y KM71 de *Pichia pastoris* del kit EasySelect *Pichia* Expresión Kit (Invitrogen, Gran Bretaña).

Se utilizó el plásmido pPICZ α a del kit EasySelect *Pichia* Expresión Kit (Invitrogen, Gran Bretaña) para clonar las regiones codificadoras correspondientes a las proteínas maduras de los genes *pgx1* y *pgx2*.

Construcción de los vectores de expresión pPIC α a-*pgx1* y pPIC α a-*pgx2*.

El cDNA de los genes *pgx2* y *pgx1* de FORL se obtuvo tal y como se ha descrito en la sección “Obtención de las secuencias del cDNA” del material y métodos del capítulo 1.

500 ng de los plásmidos con el cDNA de *pgx1* y *pgx2* se utilizaron como molde con los oligos *pgx1* 5F 5'-TAGCG **GAATTC GCC CAT GTT GAG GCT GCA C**- 3' y *pgx1* 6R 5'- CGTA **GCGGCCGC ACC TCT ACC TTC AAT TCC ATT GGT TGT GTC CCT G** – 3' para el gen *pgx1*, y *pgx2* 1F 5'-CTGCA **GAATTC AGT CAT CGC AAG GTC TAC AC**- 3' y *pgx2* 2R 5'- CGTA **GCGGCCGC ACC TCT ACC TTC AAT ACC GTT GAA CTT TCT AAC CTT** –

3' para el gen *pgx2*, en donde se introdujo una diana *EcoR* I (señalada en azul), la diana para la endonucleasa *Not* I (señalada en verde) y una secuencia de corte del Factor Xa (señalada en rojo).

Se utilizó la máquina Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) con el siguiente programa: un paso previo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 58 °C (anillamiento) y 2 minutos a 72 °C (extensión). Por último, un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C y parada a 4 °C. Se utilizó la polimerasa de copia de alta fidelidad Pwo (ROCHE Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Las bandas del tamaño deseado se cortaron y el DNA se extrajo con el kit High Pure PCR product purification kit (ROCHE Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras la purificación de los fragmentos de amplificación según lo descrito, se digirieron 400 ng de cada uno de ellos y 160 ng del plásmido pPICZ α a con las endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Not* I. Se purificó el DNA según lo descrito en el apartado anterior y se efectuó el ligamiento de 10 ng de los fragmentos *pgx1* 5F-6R y *pgx2* 1F-2R con 10 ng del plásmido pPICZ α a (Invitrogen, Gran Bretaña) y se transformó la cepa *E.coli* DH5 α con la mezcla de ligamiento según Sambrook, *et al.* (1989). Se transformó asimismo *E.coli* DH5 α con 10 ng del vector pPIC α a.

Para la selección de los transformantes bacterianos se utilizó medio LB con baja concentración de sal: 10 g/l de peptona (DIFCO, USA), 5 g/l de NaCl (Panreac, España), 5 g/l de extracto de levadura (DIFCO, USA) y 15 g/l de agar bacteriológico (DIFCO, USA) con 25 μ g/ml de Zeocina (Invitrogen, Gran Bretaña). La selección de los transformantes positivos obtenidos con la mezcla de ligamiento se realizó mediante PCR directamente sobre las colonias crecidas en medio selectivo. Para ello, se picaron diez colonias y se

traspasaron a nuevas placas con medio selectivo antes de introducirlas en la mezcla de amplificación. Se utilizaron los cebadores específicos para cada gen antes descritos y la enzima Ecotaq (Ecogen, España) con el mismo programa utilizado para amplificar sobre los clones con el cDNA de *pgx1* y *pgx2* exceptuando el número de ciclos, que en este caso fueron 30. Los clones bacterianos se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en LB con glicerol al 16%.

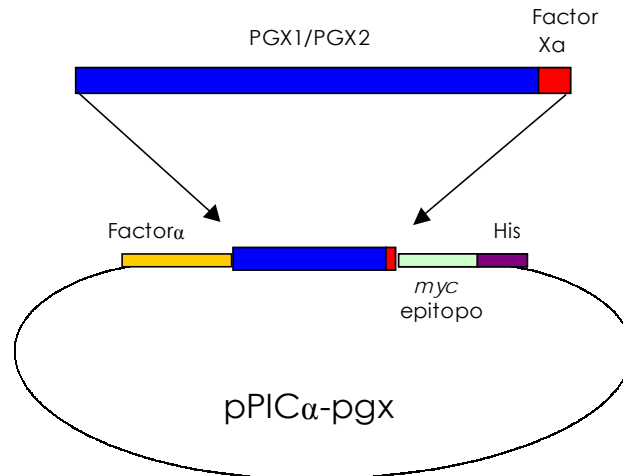


Figura 5.1: Esquema de la fusión de los genes codificadores de PGX1 y PGX2 con el Factor X α en el extremo C-terminal, con el plásmido pPIC α . Se señalan las siguientes regiones del plásmido: en naranja el péptido señal factor α , en verde el epitopo *myc* y en morado una región de poli-histidinas.

A los plásmidos obtenidos producto de la fusión las regiones de los genes *pgx1* y *pgx2* correspondientes a las proteínas maduras, con el plásmido pPICZ α se les denominó pPICZ α -*pgx1*, y pPICZ α -*pgx2*. Estos plásmidos contenían tal y como se detalla en la figura 5.1, la secuencia del péptido señal factor α , fusionada con las secuencias correspondientes a las proteínas maduras PGX1, en el caso pPIC α -*pgx1*, o PGX2, en el caso de pPIC α -*pgx2*, y fusionadas en el extremo carboxi-terminal con el epitopo *myc* y una cola de histidinas.

Transformación de las cepas de *Pichia pastoris*.

Se incubaron 4,35 μg del plásmido pPICZ α -*pgx1* y 3,8 μg del pPICZ α con la endonucleasa de restricción *Sac* I (Amersham Biosciences, Gran

Bretaña) según las instrucciones del fabricante, con el fin de linealizar los plásmidos para transformar la cepa de *P. pastoris*. A continuación, para inactivar la endonucleasa *Sac I* se incubó durante 15 minutos a 65 °C y se realizó una fenolización con PCIA de las digestiones para, posteriormente, precipitarlas mediante 1/10 volúmenes de 3M acetato sódico pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se dejaron ambos a una concentración de 400 ng/μl.

La transformación de *P. pastoris* se realizó por electroporación de células competentes preparadas según lo descrito en el protocolo del kit EasySelect *Pichia* Expresión Kit (Invitrogen, Gran Bretaña).

Se transformó la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, Gran Bretaña) con la construcción pPICαa-pgx1 y la cepa KM71 (Invitrogen, Gran Bretaña) con la construcción pPICαa-pgx2 por electroporación. Para ello se descongelaron alícuotas de 90 μl de células competentes de *Pichia pastoris* (Invitrogen, Gran Bretaña) en hielo y se mezclaron en la cubeta de electroporación de 0,2 cm con 2,5 μg de cada uno de los plásmidos pPICαa-pgx1, pPICαa-pgx2 y pPICα digeridos con *Sac I* y se mantuvieron 5 minutos en hielo. Se dio un pulso a las cubetas con el electroporador Bio-Rad Gene-Pulser (Bio-Rad, USA) preparado en las siguientes condiciones 50 μF y 200 ohmios y con la fuente de tensión dispuesta a 1500v, 25W y 25mA. Inmediatamente después del pulso se añadió a cada cubeta 1 ml de sorbitol 1M se mezcló suavemente y se transvasó a tubos donde se mantuvieron en hielo durante 2 horas. Después se añadió 1 ml de medio YPD (2% peptona, 1% extracto de levadura y 2% glucosa) y se incubó a 30°C y 250 rpm durante 4 horas. Se sembraron las células electroporadas en placas de YPDS (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 1M sorbitol y 2% agar bacteriológico) con Zeocina 100 μg/ml y se incubaron en estático durante varios días hasta observar crecimiento de colonias.

La selección de los transformantes de *P. pastoris* para los plásmidos pPICαa-pgx1 y pPICαa-pgx2 se llevó a cabo mediante PCR directamente sobre

las colonias crecidas en medio selectivo con los oligos correspondientes a cada gen y de la misma forma que la descrita para los transformantes bacterianos. Se obtuvieron diez clones positivos para cada transformación que fueron conservados a -80°C en medio BMGY (descrito en el apartado siguiente) al 16% de glicerol.

Expresión piloto de los genes *pgx1* y *pgx2* en las cepas recombinantes de *P. pastoris*.

De los clones de *P. pastoris* positivos de la transformación con los plásmidos pPIC α -*pgx1* y pPIC α -*pgx2*, se eligieron 5 en el primer caso y 4 en el segundo para los ensayos de expresión y se eligió un clon de la transformación con el plásmido pPIC α para utilizarlo como control negativo.

Los medios utilizados para los experimentos de expresión heteróloga en *P. pastoris* fueron el medio BMGY y el medio BMMY modificado. El medio BMGY se preparó de la siguiente forma: 1% extracto de levadura (DIFCO, USA), 2% peptona (DIFCO, USA), 100 mM de buffer fosfato potásico pH 6 a partir de una solución 1M preparada mezclando 132 ml de K_2HPO_4 1M con 868 ml de KH_2PO_4 1M, 1,34% de YNB con sulfato amónico y sin aminoácidos (DIFCO, USA), 4×10^{-5} % Biotina (SIGMA, Francia) y 1% glicerol. El medio BMMY descrito en el kit EasySelect *Pichia* Expresión Kit (Invitrogen, Gran Bretaña) se modificó de la siguiente forma: 0,4% extracto de levadura, 0,6% de triptona 50 mM de buffer fosfato potásico pH 6, 1,34% de YNB con sulfato amónico y sin aminoácidos, 4×10^{-5} % Biotina y 1% de metanol.

Se inocularon 400 ml de medio BMGY en matraces de 1 litro con cada uno de los 5 clones positivos pPIC α -*pgx1*, los 4 pPIC α -*pgx2* y el clon pPIC α y se cultivaron en agitación a 28°C durante dos días hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica de entre 5 y 6 a una longitud de onda de 600 nm, situación en la que se supone que las células están en fase logarítmica de crecimiento.

Se recogieron las células de cada cultivo por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 50 ml de medio BMMY modificado según lo descrito anteriormente y se traspasaron a matraces de 250 ml con hendiduras y cubiertos con miracloth para mejorar la aireación de los cultivos. Se cultivaron durante 4 días a 250 rpm y 28 °C y se recogieron muestras de 2 ml cada 24 horas añadiendo metanol hasta una concentración de 1%.

Expresión a mayor escala del gen *pgx1* en las cepas recombinantes de *P. pastoris*.

Una vez obtenido el clon que presentaba mas actividad PG, de acuerdo con el método detallado en un apartado posterior, se realizaron los cultivos de la misma forma que los cultivos piloto pero inoculando el clon con mayor actividad en 5 matraces con 400 ml de BMGY y posteriormente pasándolo a 5 matraces con 50 ml de BMMY modificado. Se recogió todo el cultivo líquido mediante centrifugación 500 rpm 20 minutos el día que presentaba mayor actividad PG (ver más adelante).

Diálisis de las muestras obtenidas de los cultivos.

Se realizó previamente diálisis de las muestras antes de valorar la actividad PG o la concentración de proteínas. Estas se llevaron a cabo a 4 °C en bolsas de diálisis cuyo límite de exclusión es 10 kDa. Las diálisis se realizaron frente a agua o frente al tampón Tris 50mM pH 7,8, 0,3 M NaCl y Tween 20 al 1%(v/v).

Proteínas en el líquido de cultivo.

La cantidad de proteínas de las muestras se valoraron según el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad, USA. Este método se basa en el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm que experimenta una solución ácida de “Coomassie Brilliant Blue” al unirse

a las proteínas. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón con albúmina de suero bovino de una concentración 5 µg/ml. Con anterioridad se había comprobado que la lectura del espectrofotómetro aumentaba linealmente hasta una concentración de 800 y 10 µg/ml respectivamente, siendo las rectas de regresión para ambos casos:

$$A_{595} = 0,0361 X + 0,0103 \quad (r = 0,99)$$

Valoración de la actividad PG de los cultivos.

La actividad PG en medios de cultivo correspondientes se midió mediante el método de Somogyi (Somogyi, 1952) y Nelson (Nelson, 1944), en el cual se determina la cantidad de sustancias reductoras presentes en una muestra problema. Este método se basa en la oxidación de azúcares y sustancias reductoras por compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

El sustrato utilizado fue ácido poligalacturónico (SIGMA, Francia) al 0,1 % (p/v), en tampón acetato 50 mM, pH 5,2. Las mezclas de reacción que contenían 50 µl de extracto enzimático y 50 µl de sustrato, se incubaron 60 minutos a 37 °C. Las determinaciones siempre se acompañaron de blancos de sustrato y de los líquidos de cultivo. Para los ensayos de afinidad al sustrato se utilizaron también trigalacturónico (SIGMA, Francia) y digalacturónico (SIGMA, Francia) a distintas concentraciones en el mismo tampón.

Previamente se determinó que la respuesta era lineal hasta una concentración de glucosa anhidra 1 mM. El rango de concentraciones abarcadas fue el comprendido entre 0,01 y 0,1 mg/ml. La ecuación de la recta obtenida fue: $A_{540} = 0,78 X + 0,015$ (r = 0,99)

Una unidad de actividad enzimática (UAE) se definió como la cantidad de enzima que libera un µmol de azúcares reductores por ml y por minuto.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las electroforesis se realizaron utilizando la cubeta "Miniprotean II" de Bio-Rad, con geles de 1mm de espesor. Se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Este sistema consta de 2 geles (electroforesis discontinua), un gel separador que se polimeriza primero y un gel concentrante que se polimeriza en la parte superior, cuyas composiciones fueron en nuestro caso:

Gel de separación (10%): se mezclan 2,5 ml de Tris-HCL 1,5 M pH 8,8, 3,25 ml de acrilamida (29%)-bisacrilamida (0,8%), 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) y 100 µl de SDS (dodecil-sulfato sódico) al 10%, llevándose a un volumen final de 10 ml con agua destilada y desionizada.

Gel de concentración: se mezclan 2,5 ml de Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8, 1,3 ml de acrilamida (29%)-bisacrilamida (0,8%), 50 µl de persulfato amónico al 10 %, 10 µl de TEMED 100 µl de SDS al 10%. Como en el caso anterior se llevó a un volumen final de 10 ml.

Las muestras se disolvieron en tampón de muestra que estaba compuesto por 4 ml de agua destilada, 1 ml de Tris-HCL (pH 6,8, 0,5M), 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS al 10%, 0,4 ml de β-mercaptoetanol y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,05%. Para las muestras de proteínas presentes en el interior celular se mezclaron 4 µl de células con 20 µl de agua y 5 µl del tampón de muestra. Tras disolverlas se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 10000 g 1 minuto. El tampón de electroforesis se preparó mezclando 3,02 g de Tris-base con 14,4 g de glicina y con 1g de SDS por litro de agua.

El potencial aplicado para separar las muestras fue de 80 V hasta que entraba la muestra en el gel separador y de 120 V durante su desplazamiento en la fase separadora.

Se utilizaron los marcadores de masa molecular de amplio rango preteñidos o sin preteñir (Bio-Rad, USA). Los patrones sin preteñir fueron miosina (208 kDa), β-galactosidasa (115 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), BSA (79,5 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) y los

preteñidos eran, miosina (208 kDa), β -galactosidasa (115 kDa), BSA (79,5 kDa), ovoalbúmina (49,5 kDa), anhidrasa carbónica (34,5 kDa), inhibidor de la tripsina (28,3 kDa) y lisozima (20,4 kDa).

Para realizar la tinción de los geles se utilizaron dos métodos alternativos Azul de Coomassie R-250 y tinción con plata. En el primer caso y una vez finalizada la electroforesis, el gel se introdujo en una solución de azul Coomassie R-250 (Bio-Rad, USA) al 0,1%, metanol al 46% y ácido acético al 7,6%. Tras 1 hora aproximadamente se destiñó con una solución de metanol-acético-agua (30:10:60)

La tinción con plata se realizó, como en el caso anterior, después de la electroforesis siguiendo las instrucciones del kit "Silver Stain Plus" (Bio-Rad, USA).

Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.

Para la transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa se utilizó la técnica de *western blot*. Esta técnica se realizó con el sistema "Mini-Trans-Blot Electrofophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad, USA). Antes de finalizar la electroforesis, se sumergieron los papeles Whatman nº3, las esponjas y los filtros de nitrocelulosa BA 85 de 0,45 μ m (Schleicher & Schuell, USA) en tampón de transferencia (3,02 g de Tris-base con 14,4 g de glicina y metanol (Merck, USA) al 20%, por litro de agua destilada). Una vez finalizada la electroforesis se lavó un minuto el gel en el tampón de transferencia anteriormente descrito. Posteriormente se colocó sobre el polo negativo del equipo de transferencia la esponja, 1 papel Whatman, el gel, la membrana de nitrocelulosa, el otro papel Whatman y la otra esponja. El montaje se realizó con guantes y se eliminaron cuidadosamente todas las burbujas.

La transferencia se llevó a cabo a 4 °C, en agitación, durante 45 minutos a un voltaje constante de 100 V .

Inmunodetección de las proteínas heterólogas.

Una vez finalizada la transferencia, los filtros se bloquearon, para evitar la unión inespecífica a proteínas, con leche desnatada al 5% en PBS en agitación durante 45 minutos.

Transcurrido este tiempo se mantiene toda la noche con una dilución 1:3000 del anticuerpo “Monoclonal Anti-polyhistidine-peroxidase Conjugate antibody” de ratón (SIGMA, Francia) en leche-PBS durante 2 horas.

Para revelar el filtro se utilizó una solución que contenía PBS (40 ml) y dos sustratos de la peroxidasa, diaminobencidina (10 mg en 5 ml de metanol) y 4-cloro1-naftol (15 mg en 5 ml de metanol), que al ser oxidados por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (10 μ l de H₂O₂ al 30%) producía bandas de color marrón de distinta intensidad según el contenido en carbohidratos.

Determinación del pH óptimo y la estabilidad al pH de PGX1.

Para realizar la determinación del pH óptimo de PGX1 se realizó el ensayo enzimático Somogyi (Somogyi, 1952) con ácido poligalacturónico (SIGMA, Francia) al 0,1 % (p/v) en diferentes soluciones tampón. La mayoría de las soluciones tampón se prepararon siguiendo las instrucciones de las tablas Geigy (Geigy, 1965).

El tampón acetato sódico (C₂H₃O₂Na, SIGMA, Francia) se preparó para un rango de pH de 3 a 5,5. El tampón fosfato salino (PBS) se preparó mezclando 1,5 mM de KH₂PO₄, 8,5 mM de Na₂HPO₄, 2,7 mM de KCl y 140 mM de NaCl (concentración final) para un rango de pH de 6 a 7,4. El Tampón TRIS salino (TBS) se preparó con TRIS HCl 50 mM pH 7,5 y 0,5 M de NaCl para un rango de pH de 8 a 9.

Para determinar la estabilidad al pH se incubaron las muestras de los cultivos dializadas frente a agua con cada una de las soluciones tampón descritas anteriormente durante 30 minutos y después se realizó el ensayo enzimático Somogyi según lo descrito en el apartado “Valoración de la actividad PG de los cultivos”.

Extracción de RNA.

Para obtener el RNA de las muestras de *P. pastoris* se utilizó el kit Total Quick RNA (TALENT, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS.

Expresión de PGX2 en *P. pastoris*.

El cDNA de la región correspondiente a la proteína madura del gen *pgx2* se clonó en el vector de expresión pPICαa y se obtuvo el vector pPICαa-*pgx2*. Con este vector se transformó la cepa de *P. pastoris* KM71 mediante electroporación y se eligieron 4 clones en los que se detectó la presencia del plásmido integrado mediante PCR, para realizar la expresión piloto en el medio inductor descrito en material y métodos.

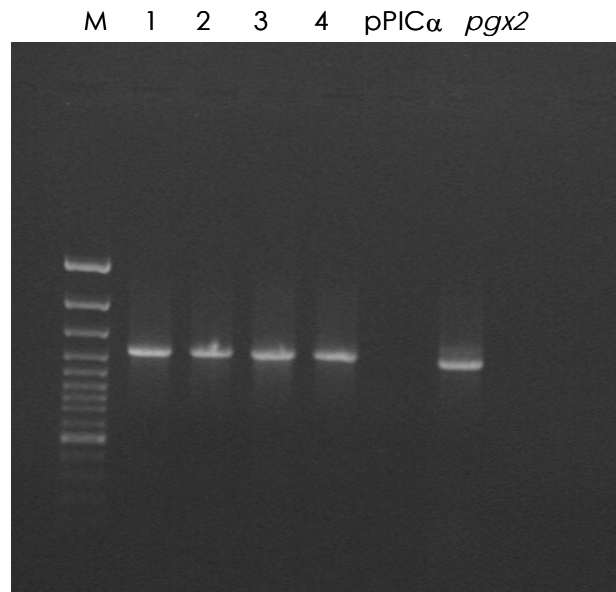


Figura 5.2: RT-PCR del RNA de los 4 clones positivos pPIC α -pgx2, y de un clon de *P. pastoris* transformado con el plásmido pPIC α utilizado como control negativo. Como control positivo se utilizó el cDNA de *pgx2*.

Como primer paso para ver si la región del gen *pgx2* introducida se estaba expresando se realizó un experimento RT-PCR con los oligos específicos del gen. Los resultados se muestran en la figura 5.2 donde se puede observar la presencia del mRNA del gen *pgx2* en los cuatro clones elegidos. Asimismo, se realizó un ensayo Somogyi para detectar actividad PG en el medio extracelular de los cultivos de los clones de *P. pastoris* recombinantes, donde no se detectó actividad PG en ninguno de los clones.

No se detectó actividad PG en el medios extracelular de los clones recombinantes transformados con la construcción pPIC α -pgx2, por lo que se procedió a la detección de la proteína mediante *western blot* con el anticuerpo específico anti-PGX2 (Patiño, 1998), tanto en el medio extracelular como en extractos de las proteínas intracelulares. En las muestras pertenecientes al medio extracelular no se pudo detectar la presencia de la proteína PGX2. Sin embargo, en las muestras intracelulares de los mismos clones, al realizar un análisis tipo *western blot* con el anticuerpo anti-PGX2, se pudo apreciar la presencia de una banda de unos 100 kDa aproximadamente, que no está

presente en el control negativo (Figura 5.3). Esta señal de distinta intensidad en los cuatro clones, podría corresponderse a la proteína PGX2 que estaría en el interior celular y no habría sido secretada al medio de cultivo.

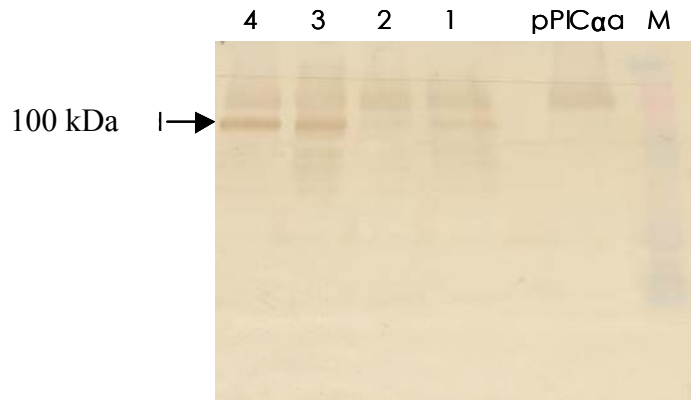


Figura 5.3: Análisis tipo *western blot* con el anticuerpo anti-PGX2 de las proteínas intracelulares de los clones de *P. pastoris* pPICαα-pgx2, 1 al 4. Se utilizó un clon de *P. pastoris* transformado sólo con el vector pPICαα como control negativo.

Expresión de PGX1 en *P. pastoris*.

Se probó también el sistema de *P. pastoris* con el gen *pgx1*. Para ello se clonó la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína madura de este gen, en el vector de expresión pPICαα y se transformó la cepa de *P. pastoris* GS115. Se obtuvieron diversos clones en los cuales se corroboró la presencia en su genoma de la inserción del vector de expresión con el gen *pgx1* mediante PCR y con los oligos apropiados.

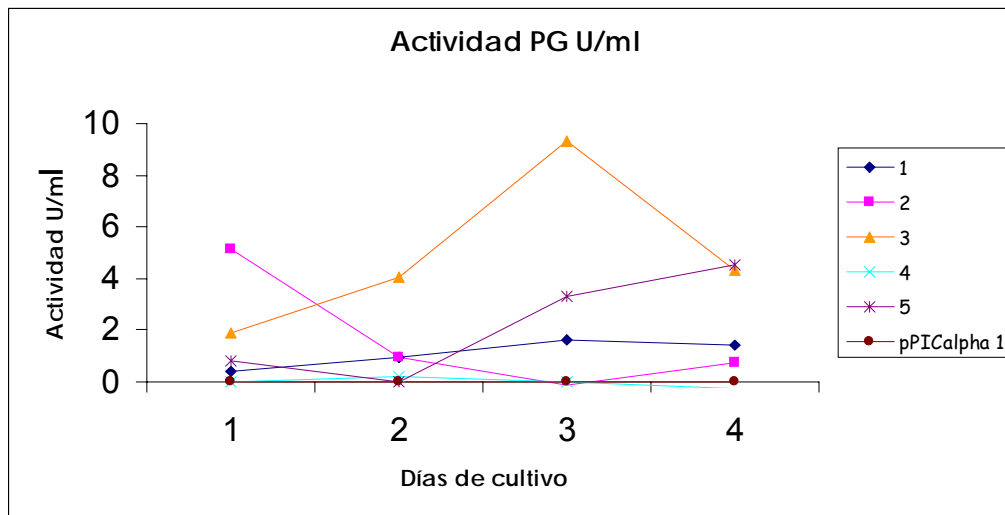


Figura 5.4: Actividad PG de los clones de *P. pastoris* transformados con el vector pPIC α -pgx1 a lo largo de cuatro días de cultivo. La cepa de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC α fue utilizada como control negativo.

De los clones positivos obtenidos se eligieron 5 para los experimentos de expresión piloto. Para ello, se iniciaron los cultivos de los 5 clones recombinantes en el medio inductor BMMY descritos en material y métodos, junto con un clon de *P. pastoris* transformado con el plásmido pPIC α como control negativo. Se recogieron muestras del medio extracelular durante 4 días de cultivo y se procedió a los ensayos para detectar actividad PG (Somogyi, 1952). Los resultados de los ensayos de valoración de actividad PG se muestran en la figura 5.4, en ellos se puede observar la presencia de actividad PG en los medios de cultivo de los clones transformados con la construcción pPIC α -pgx1, no detectándose ésta en el control negativo. Además se puede observar diferencias en la actividad entre cada uno de los clones. Estos resultados estarían indicando la presencia de PGX1 en el medio extracelular.

Se realizaron geles de SDS-PAGE y se comprobó que el patrón de proteínas de los clones transformados con pPIC α -pgx1 era diferente al del clon transformado únicamente con pPIC α . Para verificar la presencia de la proteína en el medio extracelular se realizó un análisis *western blot* con el anticuerpo anti-Histidina, que se une a la cola de histidinas presente el extremo

carboxi terminal de PGX1 de acuerdo con la construcción realizada en el vector pPIC α . No se pudo detectar ninguna señal positiva en este análisis, a pesar de que la actividad PG está presente en el medio extracelular.

Caracterización de PGX1.

Como un primer paso antes de la purificación de la PGX1 se realizaron estudios de caracterización de la misma con el fin de conocer propiedades de la enzima y ver cómo diferían con respecto a las características de la PGX2 (Patiño, 1998). Para ello se utilizaron muestras del cultivo del clon de *P. pastoris* en el que más actividad PG se obtuvo en los experimentos de expresión piloto.

pH óptimo.

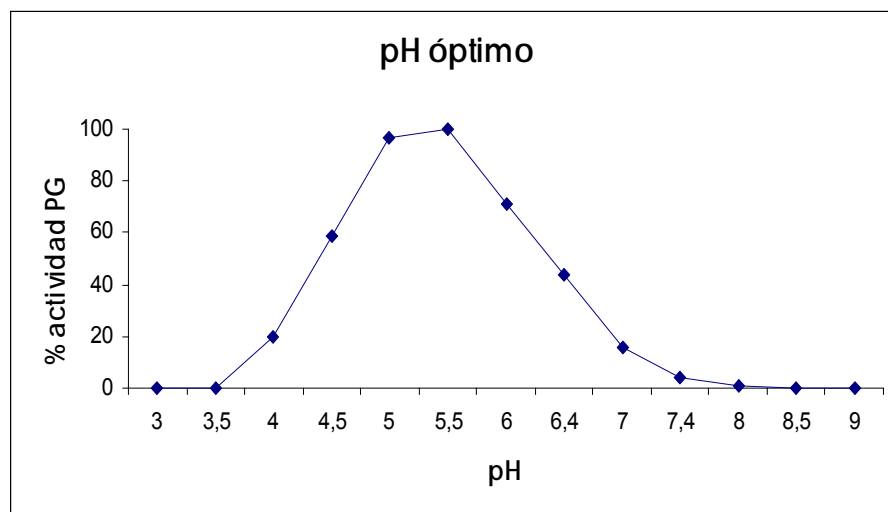


Figura 5.5: pH óptimo de PGX1.

Para el estudio del pH óptimo de la actividad PG, se utilizaron soluciones de ácido poligalacturónico al 0,1 % en tampones con diferentes valores de pH, todos ellos a una concentración 50 mM. Se cubrió un rango de pH desde 3 a 9 con los siguientes tampones: tampón acetato (desde 3 hasta 6); tampón fosfato (desde 6 a 8,) tampón Tris (desde 8,0 a 9,0). Los resultados del estudio se muestran en la figura 5.5. El valor de pH al que se obtuvo mayor actividad PG

fue 5,5, conserva un 90% de actividad a pH 5 y 6, pero la actividad desciende drásticamente en valores de pH por encima de 6,0 y por debajo de 4,5.

Estabilidad al pH.

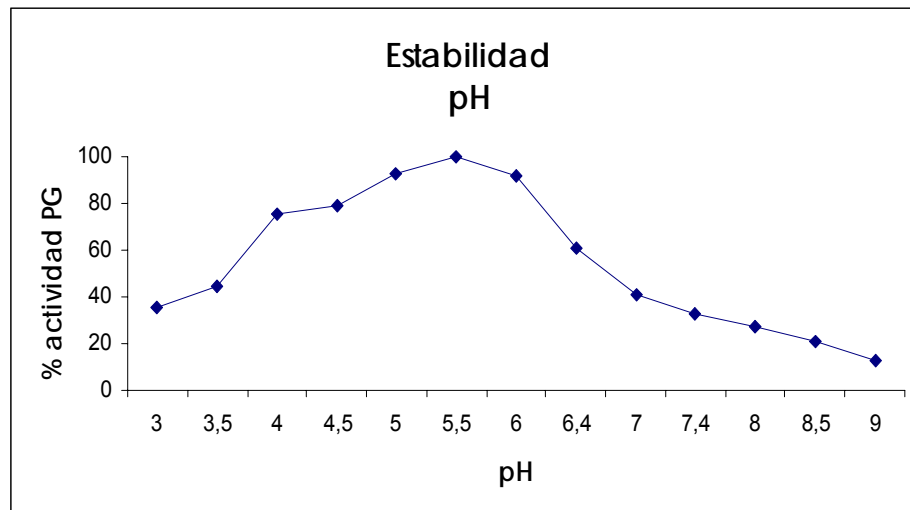


Figura 5.6: Estabilidad de PGX1 en relación al pH.

Para determinar la estabilidad al pH, la actividad PG se valoró en tampón acetato 50 mM pH 5,2 tras haber incubado las muestras durante 30 minutos en tampones a distintos pHs. Los resultados del análisis se muestran en la figura 5.6. El valor máximo de estabilidad se observa a pH 5,5, observándose una estabilidad del 60% a pH 6,4. La enzima conserva valores del 30 % a pH 3 y de más del 10 % de su actividad a pH 9.

Temperatura óptima.

La actividad se valoró en tampón acetato 50 mM pH 5,2. Se estudió un rango de temperatura que iba de 10 °C a 70 °C. Se pudo observar como la actividad iba aumentando con la temperatura hasta alcanzar un valor máximo a 45 °C (Figura 5.7), a partir de este valor la actividad sufría una caída drástica.

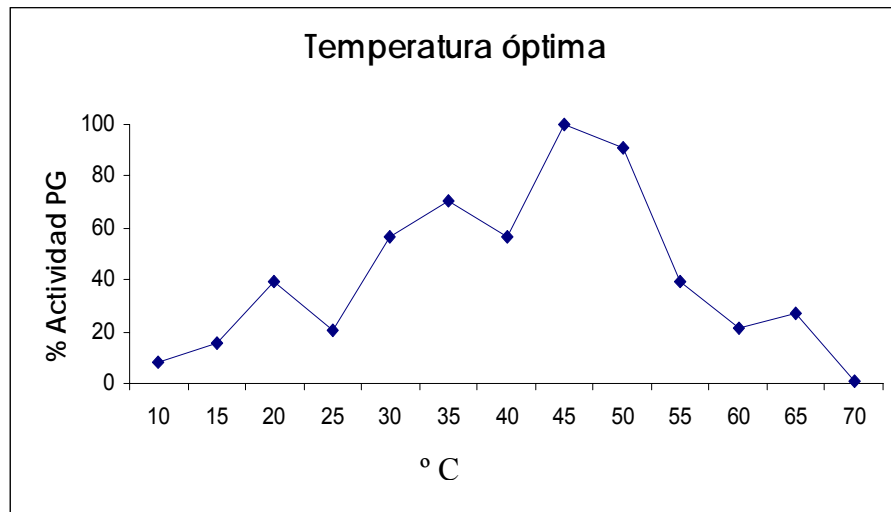


Figura 5.7: Temperatura óptima de PGX1.

Estabilidad a la temperatura.

En la figura 5.8 podemos observar como entre 10 y 40 °C después de 30 minutos de incubación no se observa pérdida alguna de actividad. A 50 °C son suficientes 25 minutos para producir una pérdida del 20 % de la actividad. La enzima pierde actividad desde los 10 minutos cuando se mantiene a 60 °C conservando sólo el 40% después de 30 minutos.

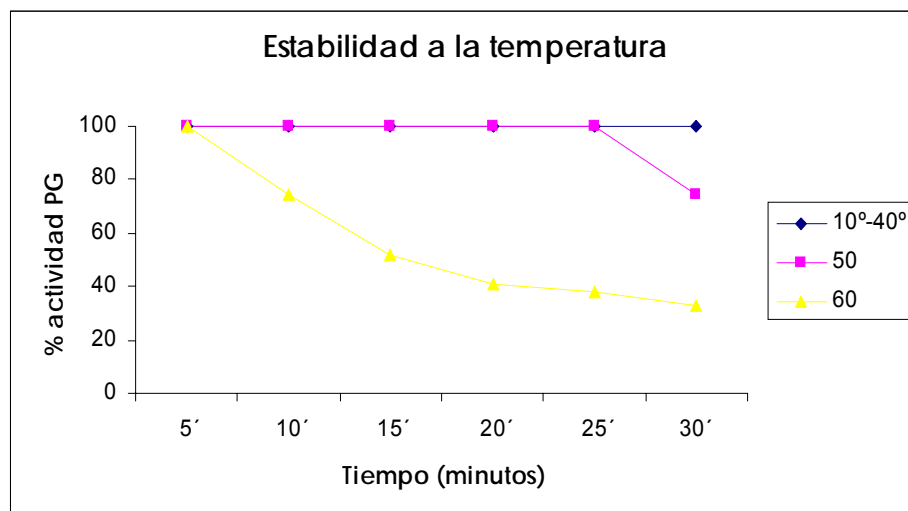


Figura 5.8: Estabilidad en relación a la temperatura de PGX1.

Afinidad de PGX1 por distintos sustratos.

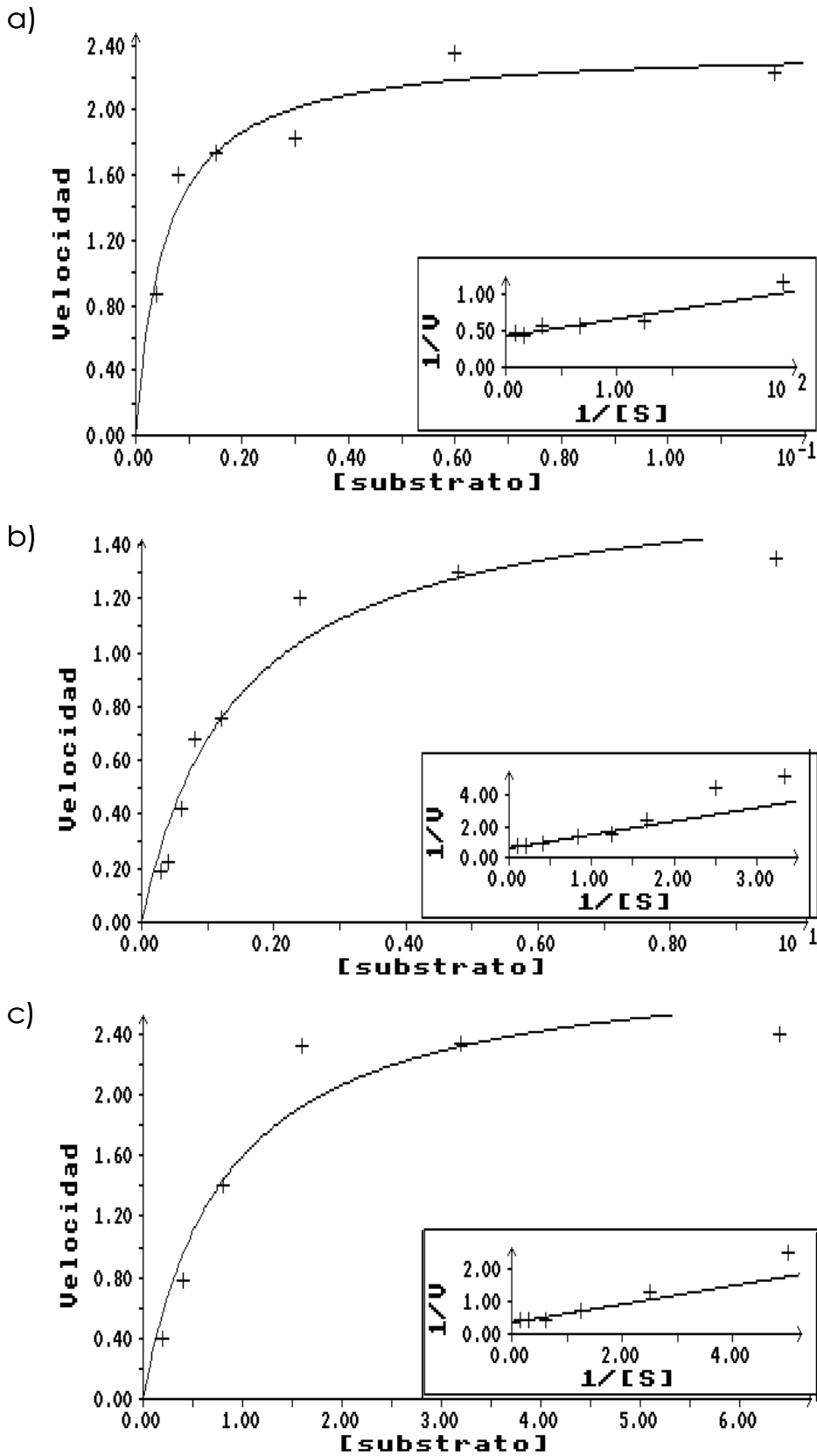


Figura 5.9: Representación de K_m y V_{max} de PGX1 expresada en *P. pastoris* utilizando como sustrato el ácido poligalacturónico (a), digalacturónico (b) y trigalacturónico (c).

Se realizaron experimentos para ver la afinidad de PGX1 por diferentes sustratos, para ello se utilizaron el ácido poligalacturónico, digalacturónico y trigalacturónico. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 5.9. Todos los valores de K_m se dan en mM (milimolar) excepto los obtenidos para el ácido poligalacturónico que se dan en concentración molar de galacturónico (M_{gal}). Se puede observar que con los tres sustratos las relaciones se ajustan a un modelo de Michaelis-Menten. De las representaciones de Lineweaver-Burk se pueden obtener unos valores de K_m de $7,13 \times 10^{-3} M_{Gal}$ (1,3 mg/ml) para el ácido poligalacturónico, de 2,93 mM (1,08 mg/ml) para el digalacturónico y de 1,53 mM (0,84 mg/ml) para el trigalacturónico. Asimismo, los valores de V_{max} son 2,54 U/ μ g para el poligalacturónico, 2,33 U/ μ g para el digalacturónico y 3,71 U/ μ g para el trigalacturónico.

DISCUSIÓN

Expresión de PGX2 en *P. pastoris* .

Previamente a la utilización de *P. pastoris* se habían probado dos sistemas de expresión heteróloga basados en la utilización de *S. cerevisiae* y *E. coli*, con el fin de obtener la exopoligalacturonasa PGX2 de FORL. Los resultados obtenidos en ambos sistemas no aportaron ninguna evidencia positiva de la presencia de la proteína ni en el medio extracelular ni en el interior celular, aunque se observó en *S. cerevisiae* la correcta transcripción del gen *pgx2*. Por tanto, se decidió probar con la levadura *P. pastoris*.

Al utilizar este sistema se pudo observar que en los clones transformantes de *P. pastoris* analizados, se produjo la correcta transcripción del gen insertado en el vector pPIC α (Figura 5.2). Aún así, los resultados obtenidos al realizar un ensayo enzimático para comprobar la presencia de actividad PG en el medio extracelular fueron negativos. Asimismo, tanto las electroforesis en geles de SDS-PAGE, como el *western blot* realizado con el anticuerpo anti PGX2 no pudieron aportar ninguna evidencia de la presencia de la proteína en el medio. Sin embargo, en el *western blot* realizado con muestras

de proteínas intracelulares de cada uno de los clones positivos pPIC α -pgx2, se pudo observar la presencia de una banda de unos 100 kDa (Figura 5.3). La masa molecular esperada de la proteína formada por la fusión de la secuencia del gen *pgx2* correspondiente a la proteína madura junto con la señal para el Factor Xa, con la secuencia del factor α y las secuencias de epítipo c-myc y la cola de histidinas presentes en el plásmido pPIC α sería de 60 kDa. Sin embargo, no habría que descartar la posibilidad de que esta señal indicase la presencia intracelular de PGX2, debido a que la masa molecular de la proteína podría aumentar por glicosilación, ya que se ha observado que en condiciones nativas esta proteína está altamente glicosilada (Patiño, 1998). También podría ser que la enzima permaneciera en el interior celular agregada a otro tipo de proteínas lo que haría que apareciera como una banda de alta masa molecular. Por otro lado, y aunque el factor α de *S. cerevisiae*, presente en pPIC α como señal de secreción de la proteína, haya dado buenos resultados para una ENDOPG de *S. cerevisiae* (Blanco, *et al.*, 2002) y, como veremos más adelante, funciona en el caso de PGX1, podría no hacerlo bien en este caso debido a características físico-químicas propias de esta enzima. Existen otras señales de secreción tales como PHO1 de *P. pastoris* o PHA-E de *Phaseolus vulgaris* (Raemaekers, *et al.*, 1999) con las que podría obtenerse una correcta secreción de esta proteína.

Expresión de PGX1 en *P. pastoris* y caracterización enzimática de la proteína heteróloga.

Se ha conseguido expresar el gen *pgx1* codificador de una EXOPG en *P. pastoris*. Varios de los clones transformados produjeron proteína activa con valores variables en los medios de cultivo adecuados. El clon que presentó los valores más elevados de actividad se eligió para realizar la caracterización físico-química de la PGX2 producida en *P. pastoris*.

El método desarrollado incluía una modificación que suponía la síntesis de una cola de histidinas en el extremo carboxi terminal de la proteína, con el objeto de facilitar su purificación, para lo que se dispone de columnas que la

pueden retener específicamente. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, ni se logró detectar mediante anticuerpos la presencia de la cola de histidinas unida a la proteína PGX1 sintetizada en *P. pastoris*.

Dado que la presencia de actividad PGs en los transformantes de *P. pastoris* sólo podría ser debida a la introducción del gen *pgx1*, nos planteamos realizar la caracterización enzimática a partir de los cultivos de uno de los clones. La dificultad que encierra la purificación de estas enzimas en el propio hongo, unido a que no se puede realizar una caracterización enzimática con los extractos del hongo por el número variable de isoformas que contribuyen a la actividad PG hace que esta aproximación en un sistema heterólogo resulte muy útil. La existencia de datos sobre la EXOPG presente en FORL (PGX2) obtenida en condiciones nativas en relación a características como (pH y temperatura óptima, estabilidad frente al pH y temperatura y afinidad por el sustrato) nos permitió analizar comparativamente las dos EXOPGs de FORL.

Se puede observar que el pH óptimo de PGX1 (5,5) (Figura 5.5) fue similar al obtenido en el caso de PGX2 (5,5) (Patiño, 1998), situándose ambos dentro del rango normal descrito para las PGs purificadas, tanto EXO (Dos, *et al.*, 2002; Di Pietro y Roncero, 1996) como ENDOPGs (Cotton, *et al.*, 2002). Por otro lado, su estabilidad frente al pH (Figura 5.6) fue mayor que la observada para PGX2, ya que ésta se inactivaba en un rango de pH de 6 a 7, valores entre los cuales se localizaba su punto isoeléctrico (Patiño, 1998). En el caso de PGX1 no se aprecia ninguna inactivación a pHs cercanos a su pl teórico 5,4. No habría que descartar que el pl teórico se alejara bastante del real, hecho que también ocurre para la proteína PGX2, cuyo pl teórico es de 8,17 y su pl estimado experimentalmente fue de 6,6 (Patiño, 1998). La actuación de enzimas que resultasen estables a rangos amplios de pH podría ser de gran importancia dentro de las complejas condiciones en las que se desarrolla la infección y colonización de la planta en las que el pH va cambiando como se ha descrito en otras interacciones como es el caso de las infecciones producidas por *S. sclerotiorum* en zanahoria (Cotton, *et al.*, 2003).

Con respecto a la temperatura las características observadas en el caso de PGX1 (Figuras 5.7 y 5.8) resultan bastante distintas a las de PGX2. PGX1 parece tener una temperatura óptima a 45° C esto se ajusta bien al descrito para EXOPGs purificadas en otros organismos como *A. tubingensis* (Kester, *et al.*, 1996), aunque difiere notablemente a la temperatura óptima de PGX2 (60 °C). Por otro lado, su estabilidad a la temperatura parece ser menor que la descrita para PGX2, ya que, a 60 °C va perdiendo actividad desde los 10 minutos y también pierde actividad con tiempos prolongados a 50 °C, mientras que PGX2 resultaba estable a 50 °C durante 30 minutos y sólo perdía un 10% de actividad después de 20 minutos a 60 °C (Vázquez, *et al.*, 1993).

Estos resultados apoyan un cierto grado de especialización de ambas enzimas siendo PGX2 más estable a la temperatura que PGX1, mientras que PGX1 resulta más estable al pH. Como hemos visto el pH del medio es un factor importante que no sólo influye en la actividad de las PGs sino también en la regulación de los genes codificadores de PGs (Cotton, *et al.*, 2003; Caracuel, *et al.*, 2003), por lo que la presencia de varias enzimas con características diferentes en relación al pH podría conferir al patógeno mejores recursos frente a condiciones cambiantes de pH durante el proceso de colonización.

Por otra parte, la obtención de enzimas individuales con estabilidad a la temperatura y/o al pH podrían resultar de gran utilidad para su aplicación en procesos industriales.

Otra característica importante de estas enzimas es su afinidad por el sustrato. Los resultados obtenidos para la enzima PGX1 heteróloga se ajustan a un modelo de Michaelis-Menten con valores de K_m de 1,3 mg/ml para el poligalacturónico, 1,08 mg/ml para el digalacturónico y 0,84 mg/ml para el trigalacturónico. Se puede constatar que esa enzima presenta una mayor afinidad por el trigalacturónico que por los otros dos sustratos. Por otro lado, los valores obtenidos para el poligalacturónico y digalacturónico no se ajustan exactamente al propuesto por Rombouts y Pilnik (1980) para la mayoría de las PGs, el cual estimaron menor de 1mg/ml. Aún así se ha observado que existe

gran variabilidad en este aspecto entre las PGs habiéndose descrito valores de K_m para el polímero desde 0,09 mg/ml como en el caso de *Geotrichum lactis* (Pardo, *et al.*, 1991) hasta de 25 mg/ml para una EXOPG de *F. oxysporum* (García Maceira, *et al.*, 1997). Los valores de la cinética obtenidos en el caso del trigalacturónico y digalacturónico estarían de acuerdo con el modo de acción “exo” de PGX1, ya que se ha observado que la hidrólisis del trigalacturónico por ENDOPGs es mucho más lenta que la del poligalacturónico a igual concentración de sustrato (Huang y Mahoney, 1999).

Los valores obtenidos difieren de los descritos para PGX2 siendo éstos de 0,13 mg/ml para el poligalacturónico, 0,24 mg/ml para el digalacturónico y 0,20 mg/ml para el trigalacturónico (Vázquez, *et al.*, 1993). De estos valores se puede deducir que PGX1 presenta una mayor afinidad por el trigalacturónico, mientras que la de PGX2 actuaría preferentemente con el poligalacturónico. La presencia de dos genes codificadores de EXOPGs que difieren en su afinidad por el sustrato también ha sido descrito en *A. niger* (Sakamoto, *et al.*, 2002) en donde la exo-PG1 presenta una amplia especificidad por oligogalacturónicos con diferentes grados de polimerización mientras que la exo-PG2 presenta una mayor afinidad por digalacturónicos.

La existencia de varias PGs con características diversas y con patrones de regulación coordinados y sensibles a las condiciones variables, tanto ambientales como de sustrato disponible, a lo largo del proceso infeccioso parece ser el modelo más compatible con los datos obtenidos de este estudio para FORL. Esta situación también podría resultar ventajosa durante la fase saprofita. En este modelo ninguna de las PGs sería crítica para producir infección, pero en condiciones naturales la ventaja de un correcto funcionamiento del sistema completo de PGs podría ser suficiente para su éxito evolutivo.

Conclusiones

1. Se han obtenido y caracterizado las secuencias genómicas de cuatro genes codificadores de poligalacturonasas dos de ellas con modo de acción “endo” y dos de modo de acción “exo”, así como las secuencias adyacentes 5´ y 3´ del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. La estructura de los genes se ajusta a los descrito en hongos filamentosos. Los cuatro genes presentan una similitud muy baja entre sí y tienen una variabilidad de secuencia muy escasa dentro del género *Fusarium*.

2. Se han determinado los residuos de aminoácidos conservados con posible significado funcional de las proteínas correspondientes a los cuatro genes de PGs de FORL así como sus estructuras tridimensionales teóricas.

3. El análisis filogenético realizado en este trabajo en base a la comparación de sus secuencias con una muestra representativa de PGs de otros hongos filamentosos y de plantas, indica que las ENDOPGs y EXOPGs forman dos grupos monofiléticos diferentes, con dos subgrupos básicos cada uno, sugiriendo una divergencia de los genes de PGs anterior a la de las especies. Los cuatro tipos fundamentales de genes de PGs están representados en una única copia en la mayoría de las especies de *Fusarium* analizadas .

4. Los cuatro genes de PGs de FORL son inducibles por sustrato y están sometidos a represión por glucosa, y presentan diferentes patrones de expresión cuantitativa y cualitativamente en cultivos *in vitro*.

5. Se ha realizado un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los cuatro genes de PGs de FORL y se ha observado la presencia de motivos reguladores relacionados con el metabolismo del nitrógeno, la represión catabólica, estrés ambiental, pH y distintas señales implicadas en el desarrollo distribuidos de forma diferencial en los cuatro promotores.

6. Se ha desarrollado un sistema para el análisis de los promotores de los cuatro genes codificadores de PGs de FORL en *S. cerevisiae*. Los

resultados del análisis de expresión dirigida por las regiones promotoras de los cuatro genes de PG en *S. cerevisiae* concuerda básicamente con el modelo de regulación por fuente carbonada deducido de estudios *in vitro*.

7. Se ha expresado la exopoligalacturonasa PGX1 de FORL en la levadura *P. pastoris* y se ha realizado una caracterización enzimática. Los valores obtenidos en relación a la temperatura, el pH, así como, a la afinidad por distintos sustratos difieren de los descritos para la otra EXOPG de FORL.

Bibliografía

- Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P. y Bakker, P.** (1998). Biological Control of *Fusarium* Wilts. En *Plant Microbe Interactions and Biological Control*, pp. 15-31. Edited by Boland, G. and Kuykendall, L. New York: Marcel Dekker INC.
- Albersheim, P.** (1965). The structure and function of the cell wall. En *Plant Biochemistry*, pp. 151-186. Edited by Bonner, J. and Varner, J. New York: Academic Press.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Andrianopoulos, A. y Timberlake, W. E.** (1994). The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-2515.
- Annis, S. L. y Goodwin, P. H.** (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur J Plant Pathol* **103**, 1-14.
- Appel, D. J. y Gordon, T. R.** (1996). Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 125-138.
- Arie, T., Gouthu, S., Shimazaki, S., Kamakura, T., Kimura, M., Inoue, M., Takio, K., Ozaki, A., Yoneyama, K. y Yamaguchi, I.** (1998). Immunological detection of endopolygalacturonase secretion by *Fusarium oxysporum* in plant tissue and sequencing of its encoding gene. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **64**, 7-15.
- Armstrong, G. M. y Armstrong, J. K.** (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.*, pp. 391-399. Edited by Nelson, P. E., Tousson, T. A. and Cook, R. J.: The Pennsylvania State University Press.
- Austwick, P. K. C.** (1984). *Fusarium* infections in man and animals. En *The Applied mycology of Fusarium*, pp. 129-140. Edited by Moss, M. O. and Smith, J. E.: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Beckman, C. H.** (1987). *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. Ed, Society, T. A. P. St. Paul, Minnesota, USA
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. y Wheeler, D. L.** (2002). GenBank. *Nucleic Acids Res* **30**, 17-20.
- Bilgrami, K. S. y Choudhary, A. K.** (1998). Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. En *Mycotoxins in agriculture and food safety*, pp. 1-46. Edited by Sihna, K. K. and Bhatnagar, D. New York: Marcel Dekker.
- Blanco, P., Thow, G., Simpson, C. G., Villa, T. G. y Williamson, B.** (2002). Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Lett* **210**, 187-191.
- Booth, C.** (1971). The species of *Fusarium*. En *The genus Fusarium*, pp. 130-155. Edited by Institute, C. M.

- Booth, C.** (1984). The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. En *The Applied mycology of Fusarium*, pp. 1-13. Edited by Moss, M. O. and Smith, J. E.: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.
- Brammall, R. A. y Higgins, H. J.** (1988). A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *Fusarium* crown and root rot disease. *Can J Bot* **66**, 915-925.
- Broach, J. R., Li, Y. Y., Feldman, J., Jayaram, M., Abraham, J., Nasmyth, K. A. y Hicks, J. B.** (1983). Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47**, 1165-1173.
- Brown, J. W., Smith, P. y Simpson, C. G.** (1996). *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Mol Biol* **32**, 531-535.
- Burnett, J. H.** (1984). Aspects of *Fusarium* genetics. En *The Applied mycology of Fusarium*, pp. 39-70. Edited by Moss, M. O. and Smith, J. E.: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Bussink, H. J., Buxton, F. P., Fraaye, B. A., de Graaff, L. H. y Visser, J.** (1992). The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur J Biochem* **208**, 83-90.
- Bussink, H. J., Kester, H. C. y Visser, J.** (1990). Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonasell of *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **273**, 127-130.
- Calmels, T. P., Martin, F., Durand, H. y Tiraby, G.** (1991). Proteolytic events in the processing of secreted proteins in fungi. *J Biotechnol* **17**, 51-66.
- Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F. y De Lorenzo, G.** (1993a). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiol Mol Plant P* **43**, 453-462.
- Caprari, C., Mattei, B., Basile, M. L., Salvi, G., Crescenzi, V., De Lorenzo, G. y Cervone, F.** (1996). Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 617-624.
- Caprari, C., Richter, A., Bergmann, C., Lo Cicero, S., Salvi, G., Cervone, F. y De Lorenzo, G.** (1993b). Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycol Res* **97**, 497-505.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I., Espeso, E. A., Gonzalez-Verdejo, C. I., Garcia-Maceira, F. I. y Di Pietro, A.** (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* **48**, 765-779.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. y Gooday, G.** (2001). *The Fungi*. Academic Press, London
- Carpita, N., Tierney, M. y Campbell, M.** (2001). Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol* **47**, 1-5.

- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during the growth. *Plant J* **3**, 1-30.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerre-Tugaye, M. T. y Dumas, B.** (1997). Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 769-775.
- Charest, P. M., Ouellette, G. B. y Pausé, F. J.** (1983). Cytological observations of early infection process by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants. *Can J Bot* **62**, 1232-1244.
- Chimwamurombe, P. M., Wingfield, B. D., Botha, A. M. y Wingfield, M. J.** (2001). Cloning and sequence analysis of the endopolygalacturonase gene from the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*. *Curr Microbiol* **42**, 350-352.
- Cho, S. W., Lee, S. y Shin, W.** (2001). The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and the modeled structure of the poligalacturonase-octagalacturonase complex. *J Mol Biol* **314**, 863-878.
- Conkova, E., Laciakova, A., Kovac, G. y Seidel, H.** (2003). Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases. *Vet J* **165**, 214-220.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. y Picard, M.** (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 411-428.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rascle, C. y Fevre, M.** (2003). Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol Lett* **227**, 163-169.
- Cotton, P., Rascle, C. y Fevre, M.** (2002). Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. *FEMS Microbiol Lett* **213**, 239-244.
- Couteaudier, Y., Alabouette, C. y Louvet, J.** (1984). Necrose du cloillet et pourriture des racines de tomate causées par un *Fusarium oxysporum*. *Agronomie* **4**, 211.
- Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M., Briley, A. y Nairn, C. J.** (2001). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res* **105**, 259-264.
- Cruickshank, R. H.** (1983). Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. *Trans Br Mycol Soc* **80**, 117-119.
- Dalboge, H.** (1997). Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 29-42.
- Daviere, J. M., Langin, T. y Daboussi, M. J.** (2001). Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genet Biol* **34**, 177-192.
- de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J. y Beijersbergen, A. G.** (1998). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**, 839-842.
- de las Heras, A., Patino, B., Posada, M. L., Martinez, M. J., Vazquez, C. y Gonzalez Jaen, M. T.** (2003). Characterization and in vitro expression

- patterns of an exopolygalacturonase encoding gene from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *J Appl Microbiol* **94**, 856-864.
- De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellicampi, D. y Cervone, F.** (1997). Fungal invasion enzymes and their inhibition. En *The Mycota. Plant Relationships, Part B*, pp. 61-83. Edited by Carroll, G. C. and Tudzinsky, P. Berlin: Springer-Verlag.
- De Lorenzo, G. y Ferrari, S.** (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 295-299.
- de Queiroz, M. V. y Daboussi, M. J.** (2003). *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 317-321.
- Deighton, F. C., Stevenson, J. A. y Cummins, G. B.** (1962). *Formae speciales* and the code. *Taxon* **11**, 70-71.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. B.** (1983). A plant DNA miniprep: a version. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19-21.
- Denison, S. H.** (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* **29**, 61-71.
- Deschamps, F., Langin, T., Maurer, P., Gerlinger, C., Felenbok, B. y Daboussi, M. J.** (1999). Specific expression of the *Fusarium* transposon *Fot1* and effects on target gene transcription. *Mol Microbiol* **31**, 1373-1383.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Meglecz, E. y Roncero, M. I.** (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**, 1140-1152.
- Di Pietro, A. y Roncero, M. I.** (1996). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett* **145**, 295-299.
- Di Pietro, A. y Roncero, M. I.** (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 91-98.
- Dos, S., Fonseca, M. y Said, S.** (2002). Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiol Res* **157**, 19-24.
- Dumas, B., Centis, S., Sarrazin, N. y 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**, 1769-1771.
- Dutton, J. R., Johns, S. y Miller, B. L.** (1997). StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **16**, 5710-5721.
- Elble, R.** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-20.
- Espeso, E. A. y Arst, H. N., Jr.** (2000). On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* **20**, 3355-3363.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst, H. N., Jr. y Penalva, M. A.** (1997). Specific DNA recognition by the

- Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* **274**, 466-480.
- Esquerre-Tugaye, M. T., Boudart, G. y Dumas, B.** (2000). Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiol Biochem* **38**, 157-163.
- Estruch, F.** (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 469-486.
- FAO/WHO** (2001) En *Who food additives series*
- Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F. y Tsernoglou, D.** (2001). Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13425-13430.
- Fekete, C., Nagy, R., Debets, A. J. y Hornok, L.** (1993). Electrophoretic karyotypes and gene mapping in eight species of the *Fusarium* sections *Arthrosporiella* and *Sporotrichiella*. *Curr Genet* **24**, 500-504.
- Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fernandes, M., Xiao, H. y Lis, J. T.** (1994). Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* **22**, 167-173.
- Fernández, N., Patiño, B. y Vázquez, C.** (1993). Pectin degrading enzymes secreted by six isolates of *Fusarium oxysporum*. *Mycol Res* **97**, 461-466.
- Fincham, J. R.** (1989). Transformation in fungi. *Microbiol Rev* **53**, 148-170.
- Flor, H. H.** (1956). The complementary genic system in flax and flax rust. *Adv In Gen* **8**, 29-54.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. y Fevre, M.** (1995). Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr Genet* **29**, 96-99.
- Fries, E.** (1821). *Systema Mycologicum*.
- Fu, Y. H. y Marzluf, G. A.** (1990). *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5331-5335.
- García Maceira, F. I., Di Pietro, A. y Roncero, M. I.** (1997). Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett* **154**, 37-43.
- García-Maceira, F. I., Di Pietro, A., Huertas-Gonzalez, M. D., Ruiz-Roldan, M. C. y Roncero, M. I.** (2001). Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2191-2196.
- García-Maceira, F. I., Di Pietro, A. y Roncero, M. I.** (2000). Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 359-365.
- García-Pedrajas, M. D. y Roncero, M. I.** (1996). A homologous and self-replicating system for efficient transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* **29**, 191-198.
- Geigy, J. R.** (1965). *Tablas Científicas-Documenta Geigy*. Basilea. Suiza

- Gerlach, W. y Nirenberg, H.** (1982). The genus *Fusarium*, a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **209**.
- Gognies, S., Simon, G. y Belarbi, A.** (2001). Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. *Yeast* **18**, 423-432.
- Gordon, T. R. y Martyn, R. D.** (1997). The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 111-128.
- Gordon, T. R. y Okamoto, D.** (1992). Population structure and the relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **82**, 73-77.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F. y Brygoo, Y.** (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol Biol Evol* **6**, 227-242.
- Guevara, M. A., M.T., G.-J. y Estévez, P.** (1997). Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Can J Microbiol* **43**, 245-253.
- Guex, N. y Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guo, W., González-Candelas, L. y Kolattukudy, P. E.** (1996). Identification of a novel *peID* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase. *Arch Biochem Biophys* **332**, 305-312.
- Gupta, R., Birch, H., Rapacki, K., Brunak, S. y Hansen, J. E.** (1999). O-GLYCBASE version 4.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res* **27**, 370-372.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E. y Kinghorn, J. R.** (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En *Gene structure in Eukaryotic microbes*, pp. 93-139. Edited by Kinghorn, J. R.: Oxford Press.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280**, 309-316.
- Henrissat, B. y Davies, G. J.** (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* **124**, 1515-1519.
- Herbert, C., Jacquet, C., Borel, C., Esquerre-Tugaye, M. T. y Dumas, B.** (2002). A cis-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem* **277**, 29125-29131.
- Hong, S. B. y Tucker, M. L.** (1998). Genomic organization of six tomato polygalacturonases and 5' upstream sequence identity with *tap1* and *win2* genes. *Mol Gen Genet* **258**, 479-487.
- Huang, L.-K. y Mahoney, R. R.** (1999). Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J Appl Microbiol* **86**, 145-156.

- Huang, Q. y Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Physiol Mol Plant P* **57**, 77-83.
- Hua-Van, A., Daviere, J. M., Kaper, F., Langin, T. y Daboussi, M. J. (2000). Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Curr Genet* **37**, 339-347.
- Jaffe, D. B., Butler, J., Gnerre, S., Mauceli, E., Lindblad-Toh, K., Mesirov, J. P., Zody, M. C. y Lander, E. S. (2003). Whole-genome sequence assembly for mammalian genomes: Arachne 2. *Genome Res* **13**, 91-96.
- Jarvis, W. R. y Shoemaker, R. A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* **68**, 1679-1680.
- Jarvis, W. R. y Thorpe, H. (1976). Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis Reprt* **60**, 1027-1031.
- Jones, J. B., Stall, R. E. y Zitter, T. A. (1991). *Fusarium* crown and root rot. En *Compendium of tomato diseases*, pp. 14. Edited by Jones, J. B., Stall, R. E. and Zitter, T. A.: APS press.
- Jones, J. P. y Woltz, S. S. (1981). *Fusarium*-Incited Diseases of Tomato and Potato and their control. En *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.*, pp. 157-168. Edited by Nelson, P. E., Tousson, T. A. and Cook, R. J.: The Pennsylvania State University Press.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. y Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**, 1075-1089.
- Jurgenson, J. E., Bowden, R. L., Zeller, K. A., Leslie, J. F., Alexander, N. J. y Plattner, R. D. (2002a). A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics* **160**, 1451-1460.
- Jurgenson, J. E., Zeller, K. A. y Leslie, J. F. (2002b). Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Appl Environ Microbiol* **68**, 1972-1979.
- Kalaitzis, P., Solomos, T. y Tucker, M. L. (1997). Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiol* **113**, 1303-1308.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* **77**, 215-227.
- Katan, J. (1971). Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology* **61**, 1213-1237.
- Kester, H. C., Benen, J. A. y Visser, J. (1999). The exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis* is also active on xylogalacturonan. *Biotechnol Appl Biochem* **30**, 53-57.
- Kester, H. C., Kusters-van Someren, M. A., Muller, Y. y Visser, J. (1996). Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur J Biochem* **240**, 738-746.

- Kippert, F.** (1995). A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of beta-galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol Lett* **128**, 201-206.
- Kistler, H. C.** (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **87**, 474-479.
- Kistler, H. C.** (2001). Evolution of the Host specificity in *Fusarium oxysporum*. En *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, pp. 70-96. Edited by Summerell, A., Leslie, J. F., Badihouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L. W.
- Kistler, H. C. y Benny, U. K.** (1988). Genetic transformation of the fungal plant pathogen, *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* **13**, 145-149.
- Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. y Tsukagoshi, N.** (1993). Structural features of a polygalacturonase gene cloned from *Aspergillus oryzae* KBN616. *FEMS Microbiol Lett* **111**, 37-41.
- Kobayashi, N. y McEntee, K.** (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 248-256.
- Kozak, M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Krikun, J., Nachmias, A., Cohn, R. y Ahakintor, L.** (1982). The occurrence of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Israel. *Phytoparasitica* **10**, 113-115.
- Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. y Jackson, B. J.** (1987). Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem* **56**, 915-944.
- Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J. y Felenbok, B.** (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **7**, 847-857.
- Laday, M. y Szecsi, A.** (2002). Identification of *Fusarium* species by isozyme analysis. *Acta Microbiol Immunol Hung* **49**, 321-330.
- Laemmli, M. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., Lugtenberg, B. J. y Bloemberg, G. V.** (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 172-179.
- Lang, C. y Dornenburg, H.** (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 366-375.
- Legerton, T. L. y Yanofsky, C.** (1985). Cloning and characterization of the multifunctional his-3 gene of *Neurospora crassa*. *Gene* **39**, 129-140.
- Leslie, J. F.** (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol* **31**, 127-150.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A. y Summerell, A.** (2001). Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol Mol Plant P* **59**, 107-117.

- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A. C., Levesque, C. A., Cammue, B. P. y Thomma, B. P. (2003). Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 113-122.
- Link, J. H. F. (1809). Observations in *Ordines. Plantarum Naturales. Nag. Ges. Naturforsch* **3**, 10.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. y Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- Lockington, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J. y Kelly, J. M. (2002). Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 190-196.
- Logemann, J., Schell, J. y Willmitzer, L. (1987). Improved Method for the isolation of RNA from plant Tissues. *Analytical Biochem* **163**, 16-20.
- MacHardy, W. E. y Beckman, C. H. (1981). Vascular Wilt *Fusaria*: Infection and Pathogenesis. En *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.*, pp. 365-390. Edited by Nelson, P. E., Tousson, T. A. and Cook, R. J.: The Pennsylvania State University Press.
- Madhani, H. D. (2000). Interplay of intrinsic and extrinsic signals in yeast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13461-13463.
- Madhani, H. D. y Fink, G. R. (1998a). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**, 348-353.
- Madhani, H. D. y Fink, G. R. (1998b). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* **14**, 151-155.
- Madhani, H. D., Galitski, T., Lander, E. S. y Fink, G. R. (1999). Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12530-12535.
- Magro, P., Di Lenna, P., Marciano, P. y Pallavicini, C. (1980). Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in *Botrytis cinerea* isolates. *J. Gen. Microbiol* **120**.
- Malardier, L., Daboussi, M. J., Julien, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. y Brygoo, Y. (1989). Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**, 147-156.
- Malathrakis, N. E. (1985). Tomato crow and root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* in Greece. *Plant Pathol* **33**, 438-439.
- Markovic, O., Janecek, S. (2001). Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng* **14**, 615-631.
- Martinez-Ruiz, A., Garcia-Ortega, L., Kao, R., Onaderra, M., Mancheno, J. M., Davies, J., Martinez del Pozo, A. y Gavilanes, J. G. (2000). Ribonuclease U2: cloning, production in *Pichia pastoris* and affinity chromatography purification of the active recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 165-169.
- Martinez-Ruiz, A., Martinez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheno, J. M., Onaderra, M., Lopez-otin, C. y Gavilanes, J. G. (1998). Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the

- methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* **12**, 315-322.
- Martius, C. F. P.** (1842). Die Kartoffel-epidemie der letzten Jahre oder die Stockfäule und Räude der Kartoffeln, geschildert und in ihren ursachlichen Verhältnissen erörtert. Akademie der Wissenschaften.
- Marzluf, G. A.** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32.
- Massee, G.** (1895). The "sleepy disease" of tomatoes. *Gard Chron Ser* **3**, 707-708.
- Menzies, J. G., Koch, C. y Seywerd, F.** (1990). Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Plant Dis* **74**, 569-572.
- Mes, J. J., Haring, M. A. y Cornelissen, B. J.** (2000a). Foxy: an active family of short interspersed nuclear elements from *Fusarium oxysporum*. *Mol Gen Genet* **263**, 271-280.
- Mes, J. J., van Doorn, A. A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B. J. y Haring, M. A.** (2000b). Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant J* **23**, 183-193.
- Mes, J. J., Weststeijn, E. A., Herlaar, F., Lambalk, J. J. M., Wijbrandi, J., Haring, M. A. y Cornelissen, J. C.** (1999a). Biological and Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* **89**, 156-160.
- Mes, J. J., Wit, R., Testerink, C. S., de Groot, F., Haring, M. A. y Cornelissen, B. J. C.** (1999b). Loss of Avirulence and Reduced Pathogenicity of a Gamma-Irradiated Mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* **89**, 1131-1137.
- Migheli, Q., Berio, T. y Gullino, M. L.** (1993). Electrophoretic karyotypes of *Fusarium* spp. *Experimen Mycol* **17**, 329-337.
- Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M. J., Soldevilla, C. y González-Jaén, M. T.** (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *Int J Food Microbiol* **89**, 213-221.
- Moore, D. y Chiu, S. W.** (2001). Fungal Products as Food. En *Bio-exploitation of Filamentous Fungi*, pp. 223-252. Edited by Pointing, S. B. and Hyde, K. D.: Fungal Diversity Press.
- Murasugi, A., Kido, I., Kumai, H. y Asami, Y.** (2003). Efficient production of recombinant human pleiotrophin in yeast, *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 2288-2290.
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. y Lusty, C. J.** (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**, 299-310.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M. y Ronne, H.** (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *Embo J* **10**, 3373-3377.
- Nelson, M. A.** (1996). Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet* **12**, 69-74.
- Nelson, N.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method to the determination of glucose. *J. Biol. Chem* **153**, 375-380.
- Nelson, P. E., Tousson, T. A. y Marasas, W. F. O.** (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press,,

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Oeser, B., Heidrich, P. M., Muller, U., Tudzynski, P. y Tenberge, K. B. (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genet Biol* **36**, 176-186.
- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D. y Fluhr, R. (1997). The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* **9**, 521-532.
- Ouyang, J., Wang, J., Deng, R., Long, Q. y Wang, X. (2003). High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **32**, 28-34.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 357-358.
- Pardo, C., Lapeña, M. A. y Gacto, M. (1991). Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Can. J. Microbiol.* **37**, 974-977.
- Parenicova, L., Benen, J. A., Kester, H. C. y Visser, J. (2000). pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J* **345**, 637-644.
- Patiño, B., Posada, M. L., González-Jaén, M. T., Martínez del Pozo, A. y Vázquez, C. (1997a). Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Can J Microbiol* **43**, 1084-1090.
- Patiño, B., Posada, M. L., González-Jaén, M. T. y Vázquez, C. (1997b). The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Microbios* **91**, 47-54.
- Patiño, B. (1998). Purificación y caracterización de una exopoligalacturonasa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Patiño, B., Rodríguez, M.C., Rodríguez, T., González-Jaén, M.T y Vázquez, C. (1999). Inmunodetección de una exopoligalacturonasa en plantas de tomate infectadas *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **25**, 529-536.
- Patthy, L. (1987). Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Lett* **214**, 1-7.
- Payasi, A. y Sanwal, G. G. (2003). Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry* **63**, 243-248.
- Peñalva, M. A. y Arst, H. N., Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 426-446, table of contents.
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. y Jenkins, J. (1998). Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J Biol Chem* **273**, 24660-24664.
- Posada, M. L. (1999). Análisis génico, regulación y variabilidad de poligalacturonasas en el género *Fusarium*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

- Posada, M. L., Patiño, B., de las Heras, A., Mirete, S., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T. (2000). Comparative analysis of an endopolygalacturonase coding gene in isolates of seven *Fusarium* species. *Mycol Res* **104**, 1342-1347.
- Posada, M. L., Patiño, B., Mirete, S., Muñoz, C., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T. (2001). Comparative analysis of polygalacturonase in isolates of seven species of *Fusarium* from *Pinus pinea*. *Mycol Res* **105**, 100-104.
- Powell, W. A. y Kistler, H. C. (1990). In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J Bacteriol* **172**, 3163-3171.
- Price, D. (1984). *Fusarium* and plant pathology: the reservoir of infection. En *The Applied mycology of Fusarium*, pp. 71-93. Edited by Moss, M. O. and Smith, J. E.: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. y Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**, 4878-4884.
- Raemaekers, R. J., de Muro, L., Gatehouse, J. A. y Fordham-Skelton, A. P. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem* **265**, 394-403.
- Reymond, P., Deleage, G., Rascle, C. y Fevre, M. (1994). Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gene* **146**, 233-237.
- Rha, E., Park, H. J., Kim, M. O., Chung, Y. R., Lee, C. W. y Kim, J. W. (2001). Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett* **201**, 105-109.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. y Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Roberts, D. A. y Boothroyd, C. W. (1984). Vascular wilt diseases in plants. En *Fundamentals of plant pathology*, pp. 76-88. New York: Freeman and company.
- Rombouts, F. M. y Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes. En *Microbial enzymes and Bioconversions*, pp. 228-272. Edited by A.H., R. Bath: Academic Press.
- Rowe, R. C. (1980). Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathology* **65**, 726-727.
- Ruiz-Diez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J Appl Microbiol* **92**, 189-195.
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann Rev Phytopathol*, 425-449.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. y Vandamme, E. J. (1993). Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties and applications. *Adv Appl Microbiol* **39**, 213-294.

- Sakamoto, T., Bonnin, E., Quemener, B. y Thibault, J. F.** (2002). Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochim Biophys Acta* **1572**, 10-18.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
- Samuels, G. J. y Blackwell, M.** (2001). Pyrenomycetes, Fungi with Perithecia. En *The Mycota. Systematics and evolution Part A*, pp. 221-255. Edited by McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A. Berlin: Springer-Verlag.
- Scazzocchio, C.** (2000). The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* **3**, 126-131.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. y Ruis, H.** (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *Embo J* **13**, 4382-4389.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M. C.** (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**, 3381-3385.
- Scott-Craig, J. S., Cheng, Y. Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J. W. y Walton, J. D.** (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1497-1503.
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. y Walton, J. D.** (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* **2**, 1191-1200.
- Seifert, K. A. y Gams, W.** (2001). The taxonomy of anamorphic fungi. En *The Mycota. Systematics and evolution Part A*, pp. 307-347. Edited by McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A. Berlin: Springer-Verlag.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. y Vos, P.** (1998). Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* **10**, 1055-1068.
- Somogyi, M.** (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem* **195**, 19-23.
- Stratilova, E., Mislovicova, D., Kacurakova, M., Machova, E., Kolarova, N., Markovic, O. y Jornvall, H.** (1998). The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase. *J Protein Chem* **17**, 173-179.
- Suga, H., Ikeda, S., Taga, M., Kageyama, K. y Hyakumachi, M.** (2002). Electrophoretic karyotyping and gene mapping of seven *formae speciales* in *Fusarium solani*. *Curr Genet* **41**, 254-260.
- Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D. y Albersheim, P.** (1973). The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol* **51**, 158-173.
- Tello, J. C. y Lacasa, A.** (1988). La podredumbre del cuello y de las raíces, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, nueva

- enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. *Bol. San. Veg. Plagas* **14**, 307-312.
- ten Have, A., Breuil, W. O., Wubben, J. P., Visser, J. y van Kan, J. A.** (2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet Biol* **33**, 97-105.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. y van Kan, J. A.** (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1009-1016.
- Teunissen, H. A., Rep, M., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. y Haring, M. A.** (2003). Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on Foxy-AFLPs. *Mol Genet Genomics* **269**, 215-226.
- Teunissen, H. A., Verkooijen, J., Cornelissen, B. J. y Haring, M. A.** (2002). Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Mol Genet Genomics* **268**, 298-310.
- Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S. y Walton, J. D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12**, 237-248.
- Toone, W. M. y Jones, N.** (1998). Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells* **3**, 485-498.
- Torki, M., Mandaron, P., Mache, R. y Falconet, D.** (2000). Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **242**, 427-436.
- Turner, P. C., Nikiema, P. y Wild, C. P.** (1999). Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutat Res* **443**, 81-93.
- Unkles, S. E.** (1992). Gene organization in industrial filamentous fungi. En *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, pp. 28-53. Edited by Kinghorn, J. R. and Turner, P. C.
- van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L. y Visser, J.** (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol* **15**, 256-263.
- van Santen, Y., Benen, J. A., Schroter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J. y Dijkstra, B. W.** (1999). 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274**, 30474-30480.
- Vázquez, C., Patiño, B. y Martínez, M. J.** (1993). Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett* **110**, 191-196.
- Vidhyasekaran, P.** (1997). Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular biology and host defense mechanisms. Marcel Dekker, INC, New York
- Voigt, K., Schleier, S. y Bruckner, B.** (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet* **27**, 528-535.
- Wagner, F., Kusserow, H. y Schafer, W.** (2000). Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 293-299.

- Wiebe, M. G.** (2002). Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 421-427.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. y Knox, J. P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**, 9-27.
- Williams, H. L., Tang, Y. y Hintz, W. E.** (2002). Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genet Biol* **36**, 71-83.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I. y Schacherer, F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**, 316-319.
- Wolf-Hall, C. E. y Schwarz, P. B.** (2002). Mycotoxins and fermentation beer production. *Adv Exp Med Biol* **504**, 217-226.
- Wubben, J. P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J. A. y Visser, J.** (1999). Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1596-1602.
- Wubben, J. P., ten Have, A., van Kan, J. A. y Visser, J.** (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr Genet* **37**, 152-157.
- Yamamoto, I., Komada, H., Kuniyasu, K., Saito, M. y Ekuza, A.** (1974). A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* inducing root rot of tomato. *Proc. Kansay plant prot. Soc* **16**, 17-29.
- Yoder, M. D., Keen, N. T. y Journak, F.** (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**, 1503-1507.
- Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C. y Turgeon, B. G.** (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* **31**, 7-20.
- Zaret, K. S. y Sherman, F.** (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**, 563-573.