

PsSt12 (Factor de transcripción) de *Penicillium digitatum* implicado en virulencia durante la infección de frutos cítricos

M. De Ramón-Carbonell y P. Sánchez-Torres* (Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia. *E-mail: palomas@ivia.es)

Se ha identificado *PdSt12* factor de transcripción en *P. digitatum* homólogo a *Ste12* que codifica una proteína de 693 aminoácidos con las secuencias típicas de dedos de zinc de los factores de transcripción.

Mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) se ha llevado a cabo tanto la sobreexpresión como la disrupción del gen *PdSt12*. Los resultados obtenidos han revelado la confirmación de la implicación este gen en patogénesis/virulencia ya que los mutantes nulos analizados presentaron una reducción en capacidad infectiva significativa así como una afectación en la capacidad de esporulación durante la infección de frutos cítricos. Y los mutantes de sobreexpresión mejoraron su capacidad de infección, en particular en los aislados cuyo parental es Pd149 que tiene menor virulencia.

Los estudios de expresión mediante qRT-PCR mostraron un incremento en el tiempo en las cepas parentales virulentas y la ausencia de expresión en los mutantes disruptos. Mientras que las cepas transformadas con copias extras del gen mostraron una inducción respecto a las cepas parentales y se produjo un incremento claro de la expresión durante la infección de la cepas virulentas Pd1 comparada con la menos virulenta.

Así mismo se confirmó el papel de este gen como regulador negativo en genes transportadores tanto MFS como ABC implicados en resistencia a fungicidas y patogénesis y en otros factores de transcripción ya que la expresión de los mismos se induce de forma llamativa en las cepas con *PdSt12* disrupto y sin embargo ejerce una regulación positiva en genes implicados en virulencia.

INTRODUCCIÓN

Penicillium digitatum es el principal agente patógeno de herida causante de la podredumbre verde en los frutos cítricos durante la postcosecha. En la actualidad, el control de los hongos durante la postcosecha se realiza mediante el empleo generalizado de fungicidas sintéticos, ya que actúan con rapidez y eficacia. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes (Viñas *et al.*, 1993) y la creciente preocupación pública sobre la salud y riesgos ambientales asociados con el alto nivel de uso de plaguicidas en las frutas se han traducido en un elevado interés en el desarrollo de métodos alternativos de control. Este interés es aún mayor ante la implementación de la directiva europea 91/414/CEE, que regula la comercialización de productos fitosanitarios, así como de otras directivas relativas a estos productos, cuya entrada en vigor conllevan una disminución del número de sustancias activas aprobadas en la Unión Europea.

El conocimiento de los mecanismos de virulencia constituye un paso muy importante para dirigir la búsqueda de nuevos tratamientos de control alternativos a los fungicidas usados actualmente.

Actualmente no existe ninguna evidencia de una ruta de transducción de señal o de un factor

específico de transcripción en hongos filamentosos en relación a resistencia de fungicidas a excepción de los descritos en *Ustilago maydis* (Orth *et al.*, 1995; RAMESH *et al.*, 2001), *Botrytis cinerea* (Cui *et al.*, 2002) y *Colletotrichum lagenarium* (Kojima *et al.*, 2004). Sin embargo, en los últimos años, se

ha descrito la implicación de varias MAP kinasas y de factores de transcripción por su papel relevante en la patogénesis/virulencia en numerosos hongos fitopatógenos. Ejemplo de ello son los factores de transcripción *CRZ1* (factor de transcripción con dedos de zinc) de *B. cinerea* necesario para el cre-

cimiento, el desarrollo y la virulencia en plantas de judía (SCHUMACHER *et al.*, 2008), *MoCRZ1* de *M. oryzae* que regula el crecimiento y la patogenicidad (CHOI *et al.*, 2009), *Ace2* de *Aspergillus fumigatus* que afecta a la virulencia (EJZYKOWICZ *et al.*, 2009) y *VdSNF1* de *Verticillium dahliae* que es necesario para virulencia y está implicado en la expresión de genes que degradan la pared celular (TZIMA *et al.*, 2011). *FgStuAp* es clave en la regulación desarrollo fúngico en *Fusarium graminearum* y su disrupción afecta a la patogénesis y al metabolismo secundario y la producción de esporas está altamente impedida (LYSØE *et al.*, 2011). *Fox1* de *U. maydis* es un factor de transcripción implicado en la regulación de genes que son necesarios para atenuar las defensas de las plantas durante el proceso de infección (ZAHIRI *et al.*, 2010). El factor de transcripción con cremallera de leucina *Moatf1* de *Magnaporthe oryzae* está implicado en la respuesta estrés oxidativo y es necesario para la virulencia del hongo (GUO *et al.*, 2010). *Fow2* y *ftf1* controlan los procesos de infección (IMAZAKI *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2010) y *Fhk1* controla la adaptación a estrés y la virulencia (RISPAIL y DI PIETRO, 2010).

Dentro de los factores de transcripción fúngicos implicados en patogenicidad uno de los más estudiados es *Ste12* (HOI and DUMAS, 2010), descrito en numerosos microorganismos y en particular en los hongos *C. lagenarium* (TSUJI *et al.*, 2003), *Colletotrichum lindemuthianum* (HOI *et al.*, 2007), *F. oxysporum* (RISPAIL y DI PIETRO, 2009; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2010) y *B. cinerea* (SCHAMBER *et al.*, 2010). En todos los casos estos factores de transcripción juegan un papel primordial en la virulencia del patógeno. Así pues, la identificación de factores de transcripción en hongos de postcosecha de frutos, y en particular de homólogos a *Ste12*, abre la posibilidad de conocer de manera más profunda los mecanismos que regulan procesos como la capacidad infectiva o virulencia, la resistencia a fungicidas y la posible implicación en el estrés oxidativo o los mecanismos de defensa del hospedador.

Resultados y discusión

Identificación de *PdSt12* factor de transcripción de *P. digitatum*

A partir de las secuencias presentes en las bases de datos se llevó a cabo el diseño de cebadores degenerados con los que se amplificó por PCR un fragmento de 1 kb que presentó homología con factores de transcripción tipo *Ste12*. Empleando este fragmento se llevó a cabo la identificación y secuen-

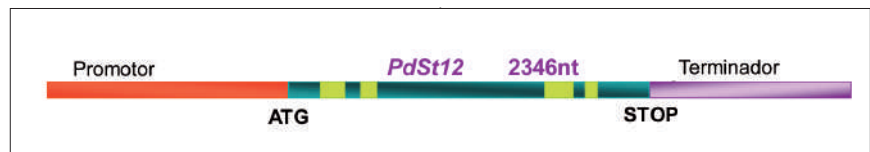


Figura 1. Estructura del gen *PdSt12* con la presencia de los 4 intrones en la zona codificante.

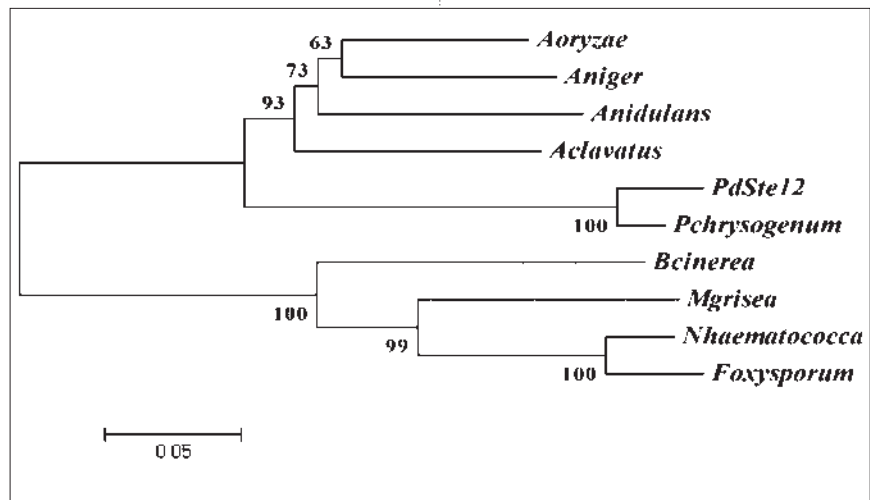


Figura 2. Árbol filogenético llevado a cabo mediante análisis Neighbour-Joining de los diferentes genes fúngicos tipo *Ste12*.

ciación completa de la versión genómica mediante una librería de *P. digitatum* proporcionada por el Dr. Luis González-Candelas. Así pues, se ha identificado un factor de transcripción en *P. digitatum* homólogo a *Ste12* al que hemos denominado *PdSt12* que presenta una pauta de lectura abierta de 2346 pb con 4 intrones y codifica una proteína de 693 aminoácidos con las secuencias típicas de dedos de zinc de los factores de transcripción (Figura 1).

Se llevó a cabo un análisis filogenético de los diferentes genes tipo *Ste12* presentes en las bases de datos y el análisis realizado mediante Neighbour-Joining demostró su proximidad con *Penicillium chrysogenum* tal y como cabía esperar, gran similitud con los genes del género *Aspergillus* y mayores diferencias con otros hongos fitopatógenos como *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum* (Figura 2) cuyos genes han mostrado su implicación en patogénesis/virulencia.

Disrupción y sobreexpresión de *PdSt12*

Con el fin de realizar un estudio de la función del gen *PdSt12* identificado, se llevó a cabo tanto la disrupción como la sobreexpresión del mismo. Para ello se realizaron contrucciones en dos plásmi-

dos binarios (pRFHU2 y pRFHU, respectivamente) cuyo marcador de resistencia es la Higromicina B mediante la técnica "ligation independent cloning" basada en el empleo de oligonucleótidos que contienen un uracilo en su secuencia y la enzima uracil-glicosidasa (USER enzyme, New England) siguiendo el protocolo descrito por Frandsen *et al.*, (2008).

Los plásmidos resultantes se introdujeron en la cepa *A. tumefaciens* C58C1 y con cada cepa resultante se procedió a transformar diferentes aislados de *P. digitatum* siguiendo el protocolo de Wang y Li, (2008) y Michielse *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Se emplearon el aislado Pd1 (virulento y resistente a fungicidas) para la disrupción y los aislados Pd27 y Pd149 (sensibles a fungicidas y virulento y poco virulento, respectivamente) para la sobreexpresión.

Los transformantes seleccionados fueron confirmados mediante PCR y se comprobó que el 40% de los transformantes de disrupción se produjo la recombinación homóloga interrumpiendo el gen del hongo parental y que todos ellos eran mutantes con ausencia de copias ectópicas mediante PCR cuantitativa (qPCR).

En el caso de los transformantes de sobreexpresión se cuantificó el número de copias extras introducidas mediante qPCR, confirmándose en todos los caso que sólo se integró una copia extra.

Evaluación de la capacidad infectiva

Todos los transformantes obtenidos, bien de disrupción como de sobreexpresión, fueron analizados desde el punto de vista de su capacidad infectiva comparándolos con su respectiva cepa parental. Para ello se infectaron frutos de naranja Navelina en cuatro puntos del eje ecuatorial y se cuantificó desde el día 3 hasta el día 7 después de la inoculación, tanto el número de frutos podridos como el diámetro de dicha podredumbre. De esta forma se observó que en el caso de los transformantes de disrupción (se seleccionaron 4 para su estudio) todo ellos mostraron una disminución de la capacidad infectiva, especialmente en los estadios tempranos de la infección, como cabe esperar en factores relevantes para la virulencia del patógeno. (Figura 3).

Además se observó que mientras que en cultivo en medio sintético los mutantes delectantes no mostraban ninguna diferencia con respecto a la cepa parental Pd1, durante la infección en frutos cítricos se observó la ausencia total de esporulación, dato relevante que pone de manifiesto la implicación del gen *PdSt12* en la conidación durante la infección (Figura 4).

Los resultados obtenidos en los mutantes de sobreexpresión relvelaron que no se veía afectada la capacidad infectiva en los mutantes de Pd27 que partía de un aislado ya virulento mientras que en el caso de los mutantes de Pd149, cuyo parental es menos viruelnto se preoducía un incremento de la capacidad infectiva, particularmente en los estadios iniciales de la infección tal y como muestra la Figura 5.

Análisis de la expresión de *PdSt12*

La evaluación la expresión del gen *PdSt12* se llevó a cabo mediante qRT-PCR en primer lugar en las cepas parentales Pd1, Pd27 y Pd149 en condiciones de crecimiento en medio sintético, observándose en todos ellos un nivel de de expresión similar sin diferencias significativas y con un incremento de la expresión con el tiempo. Los mutantes de disrupción mostraron una pérdida total del expresión confirmándose la disrupción del gen *PdSt12*. En el caso de los mutantes de sobreexpresión, todos los transformantes (tanto de Pd27 como de Pd149) mostraron un incremento de la expresión en todos los esatadios ensayados y se observó diferencias

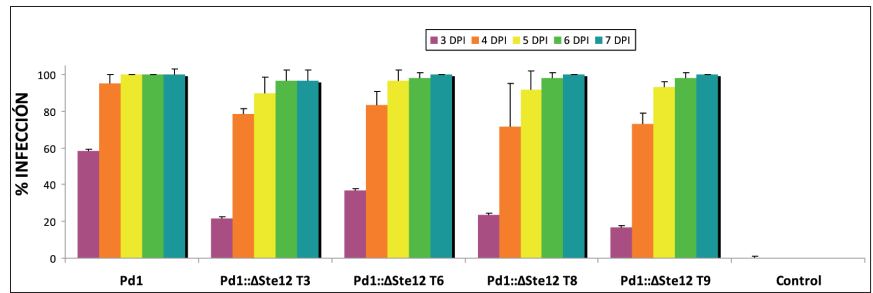


Figura 3. Evaluación de la capacidad infectiva en frutos de naranja de los mutantes disruptos en comparación con la cepa parental Pd1.

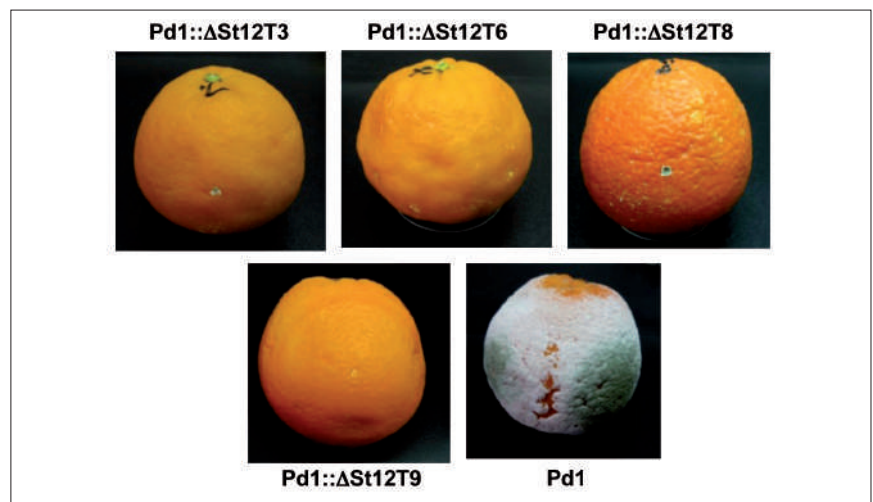


Figura 4. Efecto en la esporulación en frutos de naranja 'Navelina' tras 7 días de infección con los cuatro mutantes delectantes y la cepa parental Pd1.

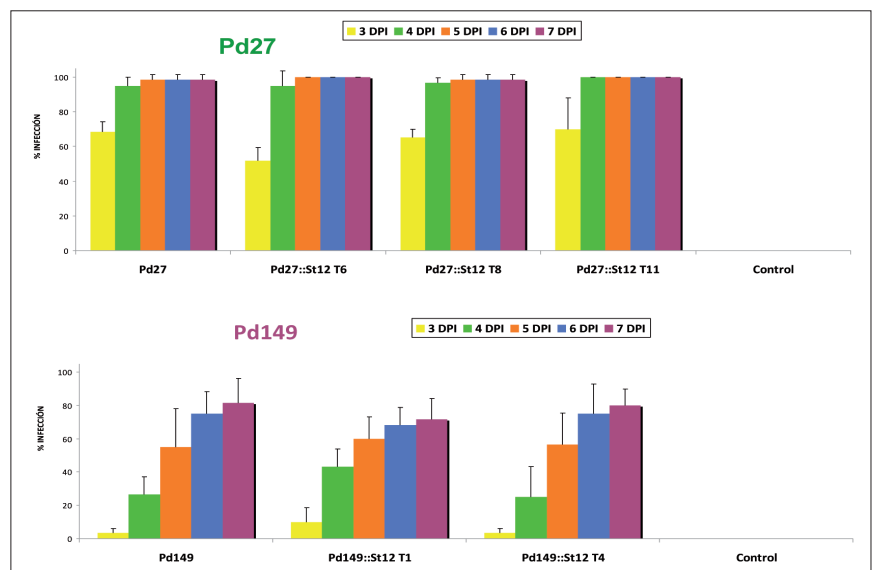


Figura 5. Evaluación de la capacidad infectiva en frutos de naranja de los mutantes de sobreexpresión en comparación con las cepas parental Pd27 y Pd149.



Textar® 60-T

(Tiabendazol)

**Sin Tiabendazol no hay conservación,
porque sólo el Tiabendazol protege la piel de sus frutos.**

© Textar es marca registrada por TECNIDEX

Fruta sana



Sanidad de Frutas y Hortalizas

TECNIDEX, Técnicas de Desinfección S.A.U., C/ Ciudad de Sevilla, 45-A
Polígono Industrial Fuente del Jarro - 46988 PATERNA (Valencia) ESPAÑA
T: +34 961 323 415 F: +34 961 321 077
e-mail: admon@tecnidex.es • www.tecnidex.es



El diseño, el desarrollo,
la producción y la
comercialización de:
Productos Plásticos, de
Decoración, Cerámicos
y Detergentes.



entre los distintos mutantes, lo cual indica que a pesar de sólo tener una copia extra integrada, la posición de integración es relevante para un mayor o menor incremento de la expresión.

Lo más significativo fue, que si existe una variación significativa de la expresión si comparamos al hongo en crecido en cultivo *in vitro* o durante la infección, de manera que la expresión se incrementa de forma considerable a las 24h durante la infección en el aislado virulento Pd1 y apenas se detecta expresión durante la infección en el aislado poco virulento Pd149, lo cual confirma una vez más el papel relevante de *PdSt12* en la virulencia del hongo *P. digitatum* (Figura 6.)

Dado que *PdSt12* como factor de transcripción puede controlar la expresión de diferentes genes, se evaluó la expresión de distintos genes de *P. digitatum* implicados en resistencia a fungicidas, patogénesis/virulencia y transducción de señales, en uno de los mutantes que presentaba la interrupción del gen *PdSt12*. De esta forma se confirmó el papel de *PdSt12* como regulador negativo en genes transportadores tanto MFS (*PdMFS1*, *PdMFS2*, *PdMFS3*, *PdMFS4*, *PdMFS5*, *PdMFS6*) como ABC (*PMR1*, *PMR5*) como transportadores de azúcares (*PdSUT1*) y en otros factores de transcripción (*PdMut3*)

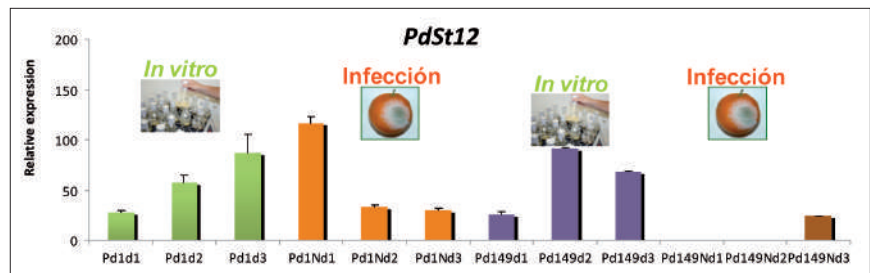


Figura 6. Evaluación temporal de la expresión mediante qRT-PCR de los aislados Pd1 y Pd149 tanto *in vitro* como durante la infección de frutos de naranja.

ya que la expresión de los mismos se induce de forma llamativa en las cepas con *PdSt12* disrupto y sin embargo ejerce una regulación positiva en genes implicados en virulencia como *CYP51* y *PdCYP51B*.

Conclusiones

Se ha identificado el gen *PdSt12* que codifica un factor de transcripción tipo Ste12 con sus dedos de zinc característicos.

La caracterización de su función mediante su interrupción revela su implicación en la virulencia del patógeno así como en su capacidad de espo-

ulación.

Su sobreexpresión permite incrementar la capacidad infectiva en aislados de virulencia reducida.

Su nivel de expresión se incrementa con el tiempo y durante la infección de frutos cítricos infectados con aislados virulentos.

A efectos de regulación ejerce un control de tipo negativo en transportadores tipo MFS, ABC y de azúcares así como en otro factor de transcripción *PdMut3*. Ejerce un control positivo sobre genes que codifican 14- α -esterol demetilases (*PdCYP51*). No ejerce efecto sobre MAPK tipo SLT2.

BIBLIOGRAFÍA

- CHOI, J., KIM, Y., KIM, S., PARK, J., LEE, Y.-H. 2009. *MOCRZ1*, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 243-254.
- CUI, W., BEEVER, R. E., PARKES, S.L., WEEDS, P.L., and TEMPLETON M. D. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* 36, 187-198.
- EJZYKOWICZ, D. E., CUNHA M. M., ROZENTAL S., SOLIS N. V., GRAVELAT F. N., SHEPPARD D. C., FILLER S. G. 2009. The *Aspergillus fumigatus* transcription factor *Ace2* governs pigment production, conidiation and virulence. *Molecular Microbiology* 72(1), 155-169.
- FRANDSEN, R. J. N., ANDERSSON, J.A., KRISTENSEN, M. B., GIESE, H. 2008. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Molecular Biology* 9: 70
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A., N. MARTÍN-RODRIGUES, B. RAMOS, J. J. DE VEGA-BARTOL, M. H. PERLIN, and J. M. DÍAZ-MINGUEZ. 2010. *fst12*, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor *Ste12*, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal Genetics and Biology* 47, 216-225.
- GUO, M., GUO, W., CHEN Y., DONG, S., ZHANG X., ZHANG, H., SONG W., WANG W., WANG Q., LV, R., ZHANG, Z., WANG, Y., ZHENG X. 2010. The basic leucine zipper transcription factor *Moatt1* mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 23,1053-1068.
- HOI, J. W. S., DUMAS, B. 2010. *Ste12* and *Ste12*-Like Proteins, *Fungal Transcription Factors Regulating Development and Pathogenicity*. *Eukaryotic Cell* 9(4), 480-485.
- HOI, J. W., HERBERT, C., BACHA, N., O'CONNELL, R., LAFITTE, C., BORDERIES, G., ROSSIGNOL, M., ROUGÉ, P., DUMAS, B. 2007. Regulation and role of a *STE12*-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Microbiology* 64, 68-82.
- IMAZAKI I., KURAHASHI, M., LIADA Y., TSUGE, T. 2007. *Fow2*, a Zn(II)2Cys6-type transcription regulator, controls plant infection of vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 63, 737-753.
- KOJIMA, K., TAKANO, Y., YOSHIMI, A., TANAKA, C., KIKUCHI, T., OKUNO, T. 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Molecular Microbiology* 53, 1785-1796.
- LYSØE, E., PASQUALI, M., BREAKSPEAR, A. and KISTLER, H.C. 2011. The transcription factor *FgStuAp* influences spore development, pathogenicity and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 24, 54-67.
- MICHELSE, C. B., HOYKAAS, J., VAN DEN HONDEL, J. J., RAM, J., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols* 3, 1671-1678.
- ORTH, A. B., RZHETSKAYA, M., PELL, E. J., TIEN, M. A. 1995. Serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 2341-2345