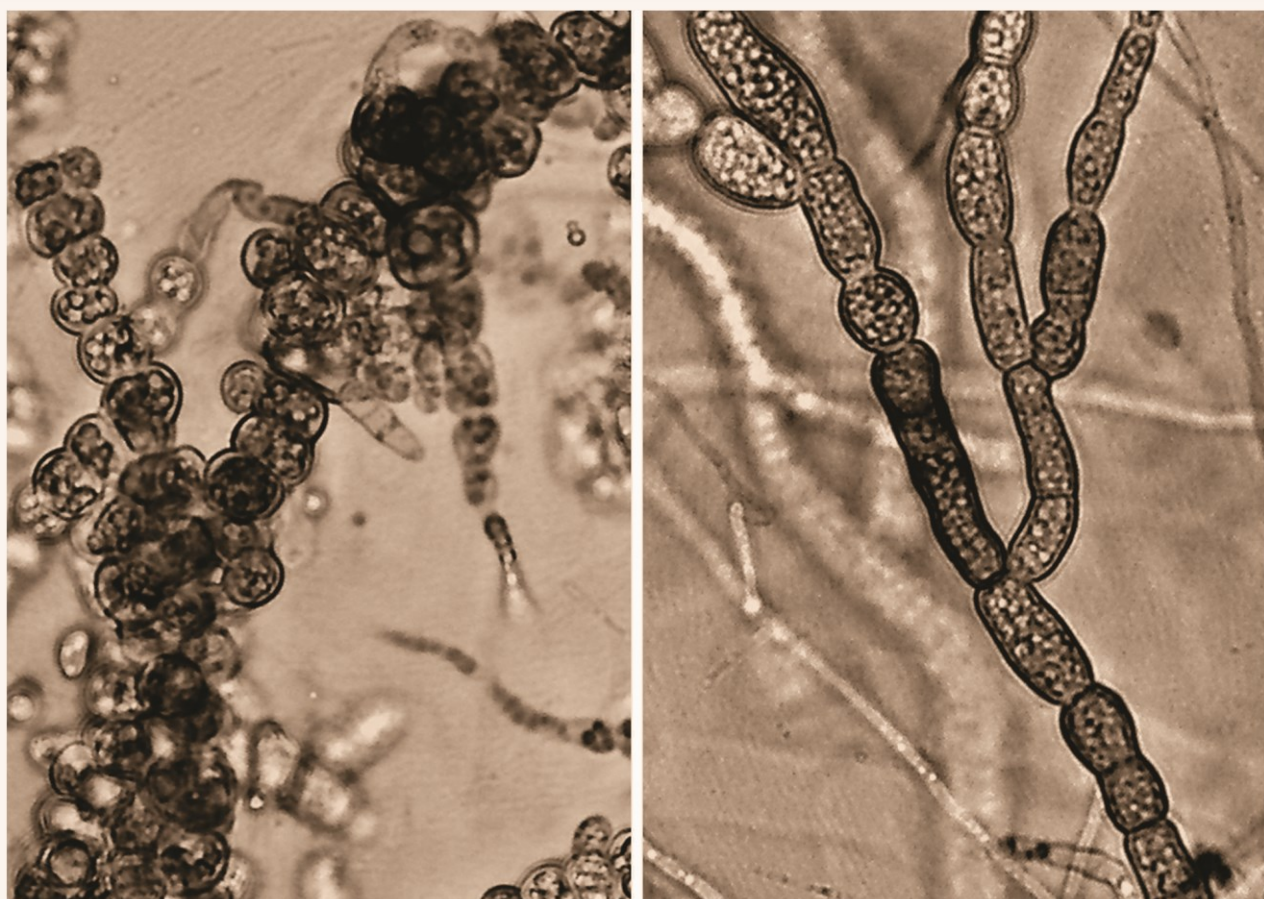


Tesis Doctoral

Directora de Tesis  
Dra. María Dolores García Pedrajas

# Caracterización funcional de factores de transcripción implicados en morfogénesis y patogenicidad en especies de *Verticillium*



**Jorge Luis Sarmiento Villamil**

Doctorado en Biotecnología Avanzada  
Universidad de Málaga - Facultad de Ciencias


UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Jorge Luis Sarmiento Villamil

 <http://orcid.org/0000-0001-9908-7959>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

## Abstract

The soilborne pathogen *Verticillium dahliae* poses a threat to many important crops worldwide. *V. dahliae* produces highly durable structures, the microsclerotia, which germinate in the presence of root exudates from the host, producing hyphae that penetrate the root cortex. Upon reaching the xylem, a combination of sporulation and filamentous growth is thought to contribute to vascular colonization. A number of genes have been identified whose alteration affects both virulence and microsclerotium development. This led to postulate that these processes are inextricably linked and co-regulated. Two major signalling pathways, MAPK cascades and cAMP signalling, have been implicated in the regulation of morphogenesis and virulence in fungi. In this work, we functionally characterized three regulatory proteins which are potential downstream targets of these regulatory pathways, revealing that microsclerotium development and virulence can be fully uncoupled. Thus, deletion of the APSES transcription factor (TF) gene *vst1* abolished microsclerotium production and altered sporulation processes but did not diminish the ability of the fungus to colonize the host. By contrast, deletion of *vph1*, a putative homolog of the major target of MAPK signalling *ste12*, did not affect vegetative growth but rendered strains avirulent. Deletion of *vhb1*, encoding a protein similar to homeobox TFs involved in sporulation and putative targets of cAMP signalling, greatly impacted sporulation but not microsclerotium development and also rendered strains avirulent. Confocal microscopy showed that  $\Delta vph1$  could not penetrate the root cortex while  $\Delta vhb1$  was impaired in its ability to proliferate in the xylem. Interestingly, a microarray analysis identified an important overlap in the genes under *Vst1* and *Vph1* regulation. We propose that different downstream targets allow the fungus to regulate particular aspects of morphogenesis and virulence through the same pathways. The specific role and putative connection with other components of the signalling pathways of each TF characterized will be discussed.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CONCLUSIONES

1. La combinación de aproximaciones de genética directa y genética reversa se ha mostrado efectiva en la identificación de factores de transcripción con funciones críticas en la regulación de los procesos de desarrollo y del crecimiento invasivo, no previamente caracterizados en las especies de *Verticillium*.
2. El factor de transcripción de tipo APSES Vst1, es un regulador crítico de la biogénesis de los microesclerocios en *V. dahliae*, estructuras de resistencia que permiten la supervivencia del patógeno en el suelo durante largos periodos de tiempo y que son principal fuente de inóculo.
3. La actividad de Vst1 es prescindible para la colonización del huésped en infecciones causadas por *V. dahliae*. Este resultado muestra que, aunque los mecanismos que regulan la producción de microesclerocios están estrechamente asociados a los que regulan la infección, ambos procesos pueden ser separados a nivel molecular, existiendo reguladores específicos de la biogénesis del microesclerocio no asociados a virulencia.
4. Vst1 controla la biogénesis del microesclerocio en estadios muy tempranos del proceso; en ausencia de esta actividad, se produce un engrosamiento inicial de las células de la hifa, pero tras ello no se observa gemación de las células engrosadas. Este resultado apoya la hipótesis de que las proteínas APSES tienen un papel altamente conservado en la regulación de los procesos de gemación, función que podría explicar en gran medida su implicación en una variedad de procesos morfogenéticos los cuales, aunque diversos, implican gemación de las células.
5. Vst1 controla la síntesis de melanina en las especies de *Verticillium*, función que es independiente de su papel en morfogénesis
6. Vst1 desempeña funciones críticas y complejas en la regulación de los procesos de esporulación en las especies de *Verticillium*, siendo su actividad esencial para la disposición verticilada de las fiálides. Este resultado proporciona pruebas adicionales del papel altamente conservado de las proteínas APSES en la regulación del correcto desarrollo de la estructura del conidióforo en los ascomicetos.
7. La ausencia de *vst1* tiene un efecto más pronunciado en los procesos de esporulación de *V. nonalfalfae* que de *V. dahliae*; la delección de *vst1* da lugar a una disminución significativa del número de conidios producidos en medio sólido en *V. nonalfalfae* pero no en *V. dahliae*. En ambas especies, la delección de *vst1* reduce significativamente las tasas de esporulación en medio líquido. Dada la complejidad de los procesos de esporulación en el género *Verticillium*, los mutantes con alteraciones en *vst1* proporcionan una herramienta para

analizar el papel de los distintos mecanismos de esporulación en el ciclo de vida de estas especies.

8. Vst1 regula la expresión de genes potencialmente implicados en las transiciones entre formas de crecimiento, incluyendo reguladores de crecimiento polar, procesos de gemación y citoquinesis, adhesión, muerte celular programada, endocitosis y remodelación de la pared celular. Vst1 es además un regulador crítico de metabolismo secundario.
9. Vst1 es un represor de la expresión de componentes de la señalización celular mediada por proteínas G y cAMP, y un regulador positivo de rutas de señalización que implican proteínas Rho y de un número importante de otros factores de transcripción, lo que indica que controla una variedad de procesos de desarrollo a través de la integración de distintas señales ambientales, y de la regulación de una variedad de factores de transcripción con distintas funciones.
10. El factor de transcripción Vph1, homólogo de Ste12, diana clave de la ruta de las MAP quinasas que controla crecimiento invasivo, es un determinante crítico de virulencia en *V. dahliae* donde controla el proceso de penetración del córtex de la raíz.
11. Vph1 no es diana de la MAPK Vmk1 en la función que ésta ejerce en la regulación del desarrollo del microesclerocio en *V. dahliae*.
12. Vph1 no juega un papel en la regulación de los procesos de desarrollo durante el crecimiento vegetativo, pero sí está implicado en los procesos morfogénéticos asociados al establecimiento de la interacción patogénica.
13. Vph1 regula diferentes actividades asociadas al establecimiento de la interacción patogénica, destacando, la producción de proteasas secretadas potencialmente implicadas en los procesos de adhesión y de alteración del tejido vegetal, y en la degradación de proteínas del huésped para evitar el reconocimiento del patógeno, la producción de CAZYS implicadas en la degradación de la pared celular vegetal, y la expresión de genes con funciones asociadas a la diferenciación morfológica de estructuras de infección.
14. Vph1 regula la expresión de posibles homólogos de genes que en otras especies fúngicas son dianas de la ruta de la MAP quinasas que controla crecimiento invasivo, lo que proporciona una prueba indirecta de su relación con la ruta de la MAPK Vmk1 en *V. dahliae*.
15. El factor de transcripción Vhb1, homólogo putativo de la proteína homeobox Hft1 implicada en la regulación de esporulación en diversas especies fúngicas, es un determinante crítico de virulencia en *V. dahliae*

16. La actividad de Vhb1 no es necesaria para los procesos de penetración pero es esencial para la proliferación en el sistema vascular
17. La delección de *vhb1* da lugar a una reducción significativa de las tasas de esporulación en medio líquido, lo que proporciona pruebas adicionales del papel conservado de los homólogos de Htf1 en regular procesos de esporulación.
18. El análisis de un mutante con alteraciones fenotípicas en morfogénesis y virulencia, generado por inserciones al azar de T-DNA, ha mostrado el potencial de esta aproximación, identificando un nuevo regulador crítico de virulencia en *V. dahliae*, no previamente asociado a los procesos virulentos en especie fúngicas.
19. La identificación de un regulador esencial de procesos de desarrollo de gran relevancia en el ciclo de la enfermedad, y de reguladores críticos de dos etapas clave de la infección, la fase de penetración y la proliferación en el sistema vascular, proporciona herramientas de valor para el análisis de la base genética de los mecanismos de adaptación de *V. dahliae* a las distintas etapas de su ciclo de vida.