TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

"Análisis evolutivo y funcional de los efectores nucleares CgEP1 y CgEP4 de *Colletotrichum graminicola*, agente causal de la antracnosis del maíz."

DOCTORANDO: Pablo García Rodríguez

PROGRAMA DE DOCTORADO: Programa de doctorado en Agrobiotecnología

DIRECTORES: Serenella Ana Sukno y Michael Ronald Thon

CENTRO DE TRABAJO: Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Área de Genética, Universidad de Salamanca.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 19 de septiembre de 2025 en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), Universidad de Salamanca.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: María del Carmen Limón Mirón (Presidenta, Universidad de Sevilla), Javier Sánchez Martín (Secretario, Universidad de Salamanca) y Silvia Rodríguez Pires (Vocal, Centro de Investigaciones Biológicas – Margarita Salas CSIC).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*

RESUMEN:

Colletotrichum es un género de hongos filamentosos fitopatógenos que causan la enfermedad de la antracnosis. *Colletotrichum graminicola* es el agente causal de la antracnosis del maíz (*Zea mays*), una enfermedad de gran impacto económico cuya incidencia está en aumento en distintas regiones del mundo y cuyos principales síntomas son el tizón foliar y la pudrición del tallo. Su éxito infeccioso depende en gran medida de la acción de proteínas efectoras, muchas de las cuales permanecen poco caracterizadas.

Esta Tesis Doctoral se centró en dos efectores nucleares clave que son parálogos entre sí: CgEP4 y CgEP1 (**C**olletorichum **g**raminicola **E**ffector **P**rotein 4 and 1). El estudio de CgEP4 reveló que se trata de un efector con localización nuclear altamente conservado, originado por una duplicación ancestral, cuya función resulta indispensable para la virulencia. Este gen está altamente conservado entre aislados de campo de *C. graminicola* de distintos continentes, lo que subraya su importancia biológica. A nivel experimental, se comprobó que CgEP4 se expresa de manera específica durante las fases iniciales de la infección y se transloca al núcleo de las células de maíz. Los mutantes de deleción mostraron una notable reducción en la capacidad de penetración y colonización, así como una activación fuerte de defensas basales en el hospedador, lo que indica que este efector cumple un papel esencial en la supresión de respuestas inmunitarias tempranas. Además, los ensayos *in vitro* revelaron que su ausencia altera procesos fúngicos fundamentales como el crecimiento, la esporulación y la tolerancia al estrés oxidativo y salino, lo que apunta a una doble función de CgEP4: actuar sobre el hospedador y, al mismo tiempo, regular aspectos internos de la fisiología del hongo.

El análisis de CgEP1 se centró en la influencia de las repeticiones en tándem que presenta en su secuencia sobre la virulencia. A partir de un conjunto de aislados naturales se identificaron variantes alélicas que diferían en el número de repeticiones intragénicas (entre 5 y 8), lo que permitió establecer una relación directa entre la arquitectura del gen y la virulencia. Experimentos de complementación funcional demostraron que se requieren al menos siete repeticiones para mantener la virulencia, mientras que alelos con menos repeticiones pierden eficacia infecciosa y se comportan como mutantes nulos. Modelados estructurales realizados con AlphaFold2 confirmaron que la pérdida de repeticiones compromete la estabilidad tridimensional de la proteína, explicando la pérdida de función. A nivel transcriptómico, se comprobó que CgEP1 no solo suprime genes de defensa en las primeras etapas de la infección, sino que también reprograma el metabolismo del maíz en fases posteriores, favoreciendo la colonización. De forma paralela, en el propio hongo regula la expresión de genes asociados a la biosíntesis proteica, al metabolismo energético y a enzimas de degradación de la pared vegetal, reforzando su papel como efector multifuncional capaz de coordinar tanto la respuesta del hospedador como la del patógeno.

En conjunto, esta tesis doctoral demuestra que CgEP4 y CgEP1 son efectores nucleares fundamentales para la virulencia de *C. graminicola*. Ambos casos ilustran la complejidad de las interacciones planta-patógeno y aportan nuevas perspectivas para el diseño de estrategias de control frente a la antracnosis del maíz.

Fotografía del acto de lectura y defensa

De izquierda a derecha: Javier Sánchez Martín (Secretario, Universidad de Salamanca), Pablo García Rodríguez (Doctorando), María del Carmen Limón Mirón (Presidenta, Universidad de

Sevilla) y Silvia Rodríguez Pires (Vocal, Centro de Investigaciones Biológicas – Margarita Salas CSIC).

Publicaciones científicas relacionadas con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y otros trabajos publicados durante el periodo de formación predoctoral

García-Rodríguez, P., Rodríguez-Mónaco, L., Cuevas-Fernández F. B., Becerra, S., Gutiérrez-Sánchez, S., Jerez-Vanegas, A., Rogerio F., Ortíz-Álvarez, J., Baroncelli, R., Espeso E. A., Thon, M. R. & Sukno, S. A. The gene *CgEP4* encodes a plant nuclear localized effector that plays a key role in *Colletotrichum graminicola* virulence in maize. (*In preparation*).

García-Rodríguez, P., Becerra, S., Gutiérrez-Sánchez, S., Rodríguez-Mónaco, L., Cuevas-Fernández F. B., Ortíz-Álvarez, J., Baroncelli, R., Thon, M. R. & Sukno, S. A. Repeat structure of the *Colletotrichum graminicola* effector CgEP1 modulates virulence and influences host and fungal transcriptomes. (*In preparation*).

Trabajos publicados en colaboraciones durante el desarrollo de esta Tesis

Rogério, F., Taati, A., **García-Rodríguez, P.**, Baroncelli, R., Thon, M. R., Santiago, R., Revilla, P., & Sukno, S. A. (2023). First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose in Galicia, northwestern Spain. *Plant Disease*, *107*(9), 2871. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0729-PDN

Rogério, F., Van Oosterhout, C., De Mita, S., Cuevas-Fernández, F. B., **García-Rodríguez, P.**, Becerra, S., Gutiérrez-Sánchez, S., Jacquat, A. G., Bettiol, W., Hosaka, G. K., Ulla, S. B., Hiltbrunner, J., Santiago, R., Revilla, P., Dambolena, J. S., Vicente-Villardón, J. L., Buhiniček, I., Sukno, S. A., & Thon, M. R. (2025). Long-distance gene flow and recombination shape the evolutionary history of a maize pathogen. *IMA Fungus*, *16*, e138888. https://doi.org/10.3897/imafungus.16.138888