

RESUMEN

Los hongos fitopatógenos representan una importante amenaza para la seguridad alimentaria, un desafío que se ve agravado por la creciente aparición de resistencias a los antifúngicos convencionales. Las proteínas antifúngicas (AFPs) producidas por hongos filamentosos son proteínas pequeñas, catiónicas y ricas en cisteína que destacan por su potencial para el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas gracias a su amplio espectro de acción, sus propiedades fisicoquímicas, su baja toxicidad y la capacidad de ser producidas biotecnológicamente. El patógeno postcosecha de frutos cítricos *Penicillium digitatum* codifica una única AFP, PdAfpB, mientras que el principal patógeno postcosecha de frutas de pepita, *Penicillium expansum*, codifica tres AFP diferentes (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC). A pesar del potencial de las AFPs para el control postcosecha, se desconocen muchos aspectos de su función biológica, regulación y mecanismos de acción. Por ello, esta tesis doctoral investiga el modo de acción de las proteínas antifúngicas PeAfpA y PdAfpB frente a *P. digitatum*, y explora sus funciones biológicas en sus respectivos hongos nativos mediante la combinación de análisis transcriptómicos y de genética funcional.

El análisis transcriptómico por RNA-Seq de *P. digitatum* tratado con la proteína PdAfpB, así como de un mutante Δ *afpB* y una cepa sobreproductora de PdAfpB, revelaron un impacto múltiple del gen *afpB* en *P. digitatum*. La delección de *afpB* tuvo un efecto limitado en el perfil transcripcional del hongo, coherente con la ausencia de producción de la proteína en la cepa parental, y cuyos cambios sugieren que el gen *afpB* contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular. Aunque no se detectó la producción de PdAfpB en la cepa sobreproductora bajo las condiciones aplicadas en el ensayo de RNA-Seq, dicha cepa mostró una respuesta transcripcional que solapa parcialmente con la de la cepa parental expuesta a la proteína PdAfpB. Además, los análisis de expresión génica y los mutantes de delección generados confirmaron que los genes que codifican la acetolactato sintasa (ALS) y la acetolactato descarboxilasa (ALD), implicadas en la ruta biosintética de la acetoina, contribuyen a la actividad inhibitoria de PdAfpB.

En *P. expansum*, la caracterización fenotípica y el análisis transcriptómico de mutantes Δ *afpA* permitieron profundizar en la función de la proteína PeAfpA en su hongo productor. La mutación de *afpA* no afectó al crecimiento axénico, la conidiación, la virulencia, la respuesta a estrés ni la sensibilidad del hongo a las AFPs producidas por *P. expansum*. Sin embargo, el análisis de RNA-Seq reveló una importante reprogramación transcripcional asociada a la producción de la proteína, incluyendo la activación de genes implicados en la remodelación de la pared celular, el metabolismo de carbohidratos y el transporte a través de la membrana, lo que sugiere una posible respuesta frente a la limitación de nutrientes. Además, se identificó la existencia de co-regulación entre los tres genes *afp* de *P. expansum*.

Finalmente, los análisis transcriptómicos comparativos revelaron que la exposición de *P. digitatum* a la proteína exógena PeAfpA desencadena un patrón de expresión génica con similitudes y diferencias respecto al activado por su AFP endógena PdAfpB. PeAfpA indujo específicamente genes implicados en el mantenimiento redox,

en la respuesta al plegamiento incorrecto de proteínas y en estrés, mientras que PdAfpB activó genes relacionados con la traducción. Además, ambas proteínas modularon genes asociados al metabolismo de pared celular y lípidos, incluyendo la represión de genes codificantes de glicosil hidrolasas y transportadores, señalando hacia una reorganización estructural de la envoltura fúngica. También se detectó la represión de genes implicados en la biosíntesis de hidrofobinas y melanina, componentes clave de la pared celular de los conidios. La delección de estos genes mostró que solo la melanina resultó crítica en la interacción de PeAfpA con la superficie de los conidios de *P. digitatum*, demostrando que distintos componentes de la pared celular participan de forma diferencial en la unión a la proteína. Sin embargo, esta interacción diferencial no cambió la sensibilidad de *P. digitatum* a las AFPs. Asimismo, la delección de otros genes diferencialmente expresados en respuesta a las AFPs, incluidos aquellos implicados en metabolismo secundario, metabolismo lipídico, regulación transcripcional y ensamblaje de la pared celular, no modificó la sensibilidad del hongo a estas proteínas, lo que apunta a un modo de acción multidiana tanto para PeAfpA como para PdAfpB. Para efectuar estos estudios funcionales, se optimizó un protocolo de edición génica mediante CRISPR/Cas9, incrementando la eficiencia de disrupción génica del 10 % a más del 80 % en *P. digitatum*. Esta mejora metodológica permitió la disrupción dirigida de distintos genes sensibles a AFPs, proporcionando una plataforma eficaz para estudios de genómica funcional en este hongo fitopatógeno de relevancia agronómica.