

## RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son una alternativa muy prometedora para el desarrollo de nuevos antifúngicos que puedan sustituir a los fungicidas utilizados en agricultura. Sin embargo, el alto coste de la síntesis química y las dificultades para su producción biotecnológica a gran escala han limitado su aplicación. Las proteínas antifúngicas (AFP) son un grupo de AMP naturales, de pequeño tamaño, catiónicas, secretadas y ricas en cisteína que ofrecen un gran potencial para desarrollar nuevas biomoléculas para el control de hongos fitopatógenos. Las AFPs están presentes de forma natural en hongos filamentosos, son muy estables y pueden producirse en grandes cantidades. Sin embargo, el papel biológico de estas AFPs en su hongo productor no se conoce en profundidad. En esta tesis doctoral, primero se estudió la diversidad de AFPs en genomas de hongos ascomicetos y se propuso una nueva clasificación en tres clases diferentes (A, B y C). *Penicillium digitatum* es el principal patógeno postcosecha de cítricos y codifica solo una AFP de la clase B en su genoma (AfpB), mientras que *Penicillium expansum*, el principal patógeno postcosecha de manzana, codifica en su genoma una AFP de cada clase (AfpA, AfpB y AfpC). En este trabajo describimos por primera vez la producción biotecnológica eficiente y la caracterización de estas cuatro AFPs.

Hemos caracterizado el papel biológico del gen *afpB* en *P. digitatum* mediante estudios de expresión génica y la generación de mutantes nulos ( $\Delta afpB$ ) y de expresión constitutiva (*afpB<sup>C</sup>*). Los resultados indicaron que *afpB* es prescindible para la biología y el ciclo de vida de este hongo, aunque la expresión del gen *afpB* bajo el promotor constitutivo *gpdA* de *Aspergillus nidulans* es perjudicial para su crecimiento y virulencia sobre frutos cítricos. Sorprendentemente, ni la cepa parental ni las cepas constitutivas produjeron cantidades detectables de AfpB a pesar de la alta expresión de su gen codificante. El modelado molecular y el diseño racional nos permitieron predecir la estructura terciaria de AfpB y diseñar péptidos sintéticos ricos en cisteínas para mapear motivos antifúngicos dentro de la secuencia primaria de la proteína. Confirmamos que los bucles catiónicos expuestos L2 y L3 mostraron una actividad antifúngica moderada y que pueden actuar de forma sinérgica.

Con el objetivo de producir AfpB mediante biotecnología, utilizamos un casete de expresión de AFPs basado en las regiones promotora y terminadora del gen *paf* de *Penicillium chrysogenum*, hongo que produce naturalmente grandes cantidades de su propia proteína PAF. Este casete funcionó de forma eficiente en *P. digitatum* y permitió la producción homóloga de AfpB. Los datos también mostraron que las secuencias del

péptido señal (SP) y el pro-péptido de la SP-Pro-AfpB no determinan la producción de proteína. También demostramos la extrema estabilidad térmica y la resistencia a la proteólisis de la AfpB de *P. digitatum*, y aportamos datos que sugieren que la estructura terciaria no es necesaria para la actividad antifúngica.

De forma similar a lo descrito para *P. digitatum*, ninguna de las tres AFPs se detectó en los sobrenadantes de cultivo en medio rico de *P. expansum*. Por el contrario, AfpA se produjo en grandes cantidades en cultivos en medio mínimo de *P. expansum* a tiempos tardíos. Para completar el repertorio de AFPs, produjimos las tres AFPs de *P. expansum* (AfpA, AfpB y AfpC) en *P. chrysogenum* con el uso del casete *paf*. De esta forma, las tres proteínas de *P. expansum* se produjeron, purificaron y caracterizaron con éxito. Ninguna de las cuatro AFPs producidas en este trabajo fue citotóxica frente a eritrocitos de mamíferos. AfpA de *P. expansum* seguida de AfpB de *P. digitatum* fueron las AFPs más activas contra hongos filamentosos, incluyendo patógenos de plantas y humanos, hongos productores de micotoxinas y sus propios hongos productores, una característica que no se había descrito previamente para las AFPs. Además, la AfpA de *P. expansum* y la AfpB de *P. digitatum* protegieron frente a la infección causada por el hongo *Botrytis cinerea* en plantas de tomate, y adicionalmente la AfpA de *P. expansum* protegió frente a *P. digitatum* en frutos de naranja. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que las AFPs son buenas candidatas para el desarrollo de nuevos antifúngicos en protección vegetal y conservación postcosecha, pero también con aplicación en medicina o conservación de alimentos.