

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



**Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y
Calidad Alimentaria**

**"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES DEL TIPO AFP EN EL
HONGO FITOPATÓGENO DE FRUTOS CÍTRICOS *Penicillium digitatum*"**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autora

Sandra M^a Garrigues Cubells

Director

Jose F. Marcos López

Tutora UPV

Ana I. Jiménez Belenguer

SEPTIEMBRE 2014

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES DEL TIPO AFP EN EL HONGO FITOPATÓGENO DE FRUTOS CÍTRICOS *Penicillium digitatum*

Sandra Garrigues, Mónica Gandía, Jose F. Marcos.

Departamento de Ciencia de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Agustín Escardino-7, Paterna, 46980 Valencia.

RESUMEN

Penicillium digitatum es el principal patógeno postcosecha de frutos cítricos. Es un hongo ascomiceto necrótrofo que penetra a través de heridas preexistentes e infecta el fruto, afectando su calidad comercial, produciendo su podredumbre y causando graves pérdidas económicas a nivel mundial.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs), tanto naturales como sintéticos, se consideran una alternativa prometedora frente a la utilización de fungicidas químicos para la protección de los cultivos y la conservación postcosecha de productos vegetales. Entre los AMPs naturales se encuentran las denominadas proteínas antifúngicas (AFPs), pequeñas proteínas catiónicas y ricas en cisteína de origen fúngico. Nuestro grupo de laboratorio ha trabajado en la identificación y caracterización de péptidos antifúngicos sintéticos (PAF) para su aplicación en el ámbito de la protección postcosecha de frutos cítricos.

La secuencia del genoma de *P. digitatum* revela la existencia de genes que podrían codificar proteínas tipo AFP. En este trabajo se han elegido tres de ellos (PdigORF_17907, PDIG_23520, y PDIG_31210) para su caracterización funcional a través de la generación de mutantes nulos mediante el mecanismo de transformación génica mediado por *A. tumefaciens* (ATMT) y recombinación homóloga. Paralelamente se ha determinado la sensibilidad a péptidos antimicrobianos en diferentes cepas mutantes de *P. digitatum*, y se ha estudiado la sinergia entre el péptido sintético PAF26 y el péptido PAF112 derivado de la secuencia AFP de *P. digitatum* PDIG_68840. Los resultados revelan la necesidad de la secuencia completa de PAF112 para ejercer una actividad antimicrobiana sinérgica con PAF26.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos (AMPs), proteínas antifúngicas (AFPs), Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), *Penicillium digitatum*.

ABSTRACT

Penicillium digitatum is the main citrus postharvest pathogen. It is an ascomycete necrotrophic fungus that penetrates orange fruits through pre-existent wounds, affecting their commercial quality, producing fruit rot and causing economic losses worldwide.

Natural and synthetic antimicrobial peptides (AMPs) are considered a potential alternative to chemical fungicides for crop protection. Among natural AMPs, we can find small cationic cysteine-rich proteins called antifungal proteins (AFPs) of fungal origin. In our laboratory we have worked in the identification and characterization of synthetic antifungal peptides (PAF) for their application in the protection of citrus fruits.

The *P. digitatum* recently sequenced genome shows existing genes that could probably codify AFP-like proteins. In this work, we have chosen three of these genes for their functional characterization using the *A. tumefaciens* mediated transformation mechanism (ATMT) and homologous recombination.

On the other hand, the sensitivity to antifungal peptides has been determined in different *P. digitatum* strains, and the synergy between PAF26 and PAF112, derived from the *P. digitatum* AFP sequence PDIG_68840, has been identified. The results show the need for the complete sequence of PAF112 to establish an antimicrobial synergetic interaction with PAF26

Key words: Antimicrobial peptides (AMPs), antifungal proteins (AFPs), *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT), *Penicillium digitatum*.

RESUM

Penicillium digitatum és el principal patògen postcollita de fruits cítrics. És un fong ascomicet necròtrof que penetra a través de ferides preexistents i infecta el fruit, afectant a la seua qualitat comercial, produint la seua podridura i causant greus pèrdues econòmiques a nivell mundial.

Els pèptids antimicrobians (AMPs), tant naturals com sintètics, es consideren una alternativa prometedora enfront la utilització de fungicides químics per a la protecció dels cultius i la conservació postcollita de productes vegetals. Entre els AMPs naturals es troben les denominades proteïnes antifúngiques (AFPs), unes xicotetes proteïnes catióniques i riques en cisteïna d'origen fúngic. El nostre grup de laboratori ha treballat en la identificació i caracterització de pèptids antifúngics sintètics (PAF) per a la seua aplicació en l'àmbit de la protecció de fruits cítrics.

La seqüència del genoma de *P. digitatum* revela l'existència de gens que podrien codificar proteïnes tipus AFP. En este treball s'han triat tres d'ells (PdigORF_17907, PDIG23520 i PDIG31210) per a la seua caracterització funcional a través de la generació de mutants nuls per mitjà del mecanisme de transformació gènica mediat per *A. tumefaciens* (ATMT) i recombinació homòloga. Paral·lelament s'ha determinat la sensibilitat a pèptids antimicrobians en diferents ceps mutants de *P. digitatum*, i s'ha caracteritzat la sinergia entre l'hexapèptid sintètic PAF26 i el pèptid PAF112 derivat de la seqüència AFP de *P. digitatum* PDIG_68840. Els resultats revelen la necessitat de la seqüència completa de PAF112 per a exercir una activitat inhibidora sinèrgica amb PAF26.

Paraules clau: Pèptids antimicrobians (AMPs), proteïnes antifúngiques (AFPs), Transformació mediada per *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), *Penicillium digitatum*.

1 INTRODUCCIÓN

El sector hortofrutícola representa el principal sector agrario por excelencia en España. En el año 2012 se produjeron más de 23 millones de toneladas de frutas y hortalizas, siendo la mayor parte de esta producción destinada a la exportación (www.magrama.gob.es).

Los cítricos son el cultivo de árbol frutal más importantes a nivel mundial y particularmente a nivel nacional, representando aproximadamente el 24% de la producción total de frutas y hortalizas, lo que corresponde a una producción de más de 5 millones de toneladas de frutos cítricos cada año (faostat3.fao.org). Sin embargo, uno de los problemas más significativos de la citricultura española son las pérdidas de producción tras la recolección, ya que los frutos cítricos son particularmente susceptibles a daños bióticos y abióticos durante los procesos de almacenamiento y transporte, disminuyendo la calidad organoléptica y comercial de los frutos y provocando graves pérdidas económicas a nivel mundial (<http://www.fao.org/docrep/t0073e/t0073e00.HTM>).

Entre los organismos patógenos de frutos cítricos destaca por su incidencia *Penicillium digitatum*, un hongo ascomiceto necrótrofo con gran especificidad de huésped, que infecta a través de heridas preexistentes en el fruto y que causa la podredumbre del mismo, conocida como podredumbre verde (Tuset, 1987).

En la actualidad, el uso de fungicidas químicos es el principal método empleado para proteger los cultivos frente a las infecciones causadas por hongos (Knight *et al.*, 1997; Holmes y Eckert, 1999). Sin embargo, la aplicación de estos compuestos químicos en la agricultura presentan serias desventajas, como su actividad inespecífica frente a otros microorganismos no perjudiciales (Yang *et al.*, 2011), la aparición de cepas resistentes (Holmes y Eckert, 1999) o sus efectos negativos para el medioambiente o la salud humana, que pueden abarcar desde simples irritaciones cutáneas hasta daños en el sistema reproductivo y posible carcinogenicidad (Brooks y Roberts, 1999). Estos problemas han impulsado el estudio y la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades causadas por hongos que presenten una mayor especificidad y escasos o nulos efectos para la salud de los consumidores, agricultores y para el medio ambiente sin que afecten a la calidad final de los productos.

Los péptidos antimicrobianos naturales (AMPs) son péptidos o pequeñas proteínas catiónicas producidas por organismos de muy distinta escala filogenética (Hancock y Sahl, 2006) que presentan actividad antibiótica y/o antifúngica directa. Su pequeño tamaño posibilita su diseño racional y síntesis química (Marcos *et al.*, 2008), por lo que se presentan como alternativas prometedoras frente a las infecciones causadas por microorganismos. Dentro del grupo de AMPs naturales destacan una serie de proteínas conocidas como proteínas antifúngicas (AFPs) que poseen entre 6 y 10 residuos de cisteína formando puentes disulfuro, tienen un motivo conservado en su secuencia, denominado motivo γ y son sintetizadas y secretadas al medio por hongos filamentosos en grandes cantidades (Galgóczy *et al.*, 2010). Entre las AFPs descritas hasta el momento, destacan las hasta ahora más estudiadas de *Aspergillus giganteus* (Campos-Olivas *et al.*, 1995) y *Penicillium chrysogenum* (llamada PAF) (Marx *et al.*, 2008; Batta *et al.*, 2009), aunque existen otras proteínas descritas producidas por otros hongos ascomicetos como la AnAFP de *Aspergillus niger* (Gun Lee *et al.*, 1999) o las de *Aspergillus clavatus* (Skouri-Gargouri y Gargouri, 2008; Skouri-Gargouri *et al.*, 2010), entre otras.

La función biológica de las AFPs para los hongos productores todavía no está totalmente descrita (Galgóczy *et al.*, 2010). Se han obtenido mutantes nulos del gen *paf* en *P. chrysogenum* que presentan un fenotipo diferencial durante la conidiogénesis, reduciéndose la producción de esporas hasta en un 70 % (Hegedus *et al.*, 2011), lo cual sugiere que esta proteína AFP modula el desarrollo asexual del hongo. Hasta la fecha se desconoce hasta qué punto la actividad antifúngica de las AFPs está relacionada con su función natural o se trata más bien de un “artefacto” sin relación con la biología del hongo productor.

El genoma de *P. digitatum* revela la existencia de posibles genes que codificarían pequeñas proteínas ricas en cisteína que podrían tratarse de AFPs (Marcet-Houben *et al.*, 2012), y que en este trabajo se han denominado genéricamente del tipo AFP. Se han seleccionado cuatro de ellos para su estudio más en profundidad en este trabajo: el gen PdigORF_17907 que tiene homología de secuencia con el extremo C-terminal de una bomba ATPasa de Na-K de tipo P; el gen PDIG_23520, cuya proteína codificada demostró ser secretada al medio de cultivo líquido de *P. digitatum* PHI-26 a tiempos tardíos de incubación; y los genes PDIG_31210 y PDIG_68840, cuyos análisis filogenéticos previos los agrupan con otras AFPs de otros hongos filamentosos, codificando PDIG_68840 una proteína que comparte un 91% de identidad con la PgAFP recientemente descrita en *P. chrysogenum* (Rodríguez-Martín *et al.*, 2010).

Este trabajo fin de máster ha constado de dos partes diferenciadas. Por un lado se ha iniciado la obtención de las construcciones de DNA para la transformación genética de *P. digitatum* PHI-26 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Wang y Li, 2008), con el objetivo de obtener mutantes nulos mediante recombinación homóloga de los genes PdigORF_17907, PDIG_23520 y PDIG_31210 y así poder caracterizar su función. Por otro lado, se ha estudiado la actividad antifúngica del hexapéptido sintético PAF26 (Lopez-Garcia *et al.*, 2002) y de péptidos sintéticos derivados de la secuencia AFP del gen PDIG_68840, así como la posible sinergia entre ellos, en diferentes cepas mutantes de *P. digitatum*, con el fin de desarrollar tratamientos conjuntos que mejoren la conservación postcosecha y la calidad de los frutos cítricos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos y medios de cultivo

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron *Penicillium digitatum* PHI-26 CECT 20796 (Lopez-Garcia *et al.*, 2000), el cual se trata de una cepa muy virulenta frente a frutos cítricos y cuyo genoma ha sido secuenciado recientemente (Marcet-Houben *et al.*, 2012), la cepa mutante de *P. digitatum* PDMG672 que tiene alterado un gen de biosíntesis de quitina, un polisacárido estructural presente en la pared celular de los hongos (Gandia *et al.*, 2014); la cepa PDEH515 mutante en un gen que codifica una proteína manosiltransferasa (PMT2) (Harries *et al.*, manuscrito en preparación), encargada de la O-glicosilación de proteínas y que ha demostrado ser esencial en la integridad de la pared celular de hongos (Gentsch y Tanner, 1996; Harries *et al.*, 2013), y por último la cepa PDMG122, un mutante nulo en el gen PDIG_68840 recientemente obtenido en nuestro laboratorio.

Los conidios de las distintas cepas de *P. digitatum* se recogieron en agua estéril rascando placas de medio agar patata dextrosa (PDA) (Difco) esporuladas tras 7-10 días de crecimiento a 24°C con asas estériles y un posterior filtrado del material obtenido para eliminar restos de micelio. Las concentraciones de conidios se ajustaron tras un recuento de la concentración en una cámara cuentaglóbulos. Los experimentos de crecimiento del hongo en medio líquido se realizaron en caldo de dextrosa de patata (PDB) (Difco) a 24°C.

2.2 Análisis de secuencias

Los estudios de las secuencias de los genes de *P. digitatum* PHI-26 seleccionados para su disrupción, PdigORF_17907, PDIG_23520 y PDIG_31210, se realizaron a partir de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y de la base de datos MycoCosm (<http://genome.jgi.doe.gov/>) (Nordberg *et al.*, 2014) (TABLA 11).

La representación gráfica de las secuencias junto con el análisis de restricción se realizó con la herramienta bioinformática DNAMAN (versión 4.03, Lynnon Corp.).

TABLA 1. Genes de tipo AFP en *P. digitatum* analizados

ORGANISMO	GEN	ENTRADA NCBI	COORDENADAS MYCOCOSM
<i>P. digitatum</i>	PdigORF_17907	AKCT01000340.1	Scaffold_90:173333-189999
<i>P. digitatum</i>	PDIG_23520	AKCT01000108.1	Scaffold_31:323078-323521
<i>P. digitatum</i>	PDIG_31210	AKCT01000131.1	Scaffold_33:91729-91974

2.3 Obtención de las construcciones para la disrupción génica

Para la obtención de las construcciones génicas que se emplearán para la disrupción por recombinación homóloga de los genes PdigORF_17907, PDIG_23520 y PDIG_31210, se siguió el procedimiento de PCR de fusión (Szewczyk *et al.*, 2006).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los extremos flanqueantes en 5' y 3' de los genes seleccionados mediante la herramienta DNAMAN (TABLA 2) que fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen™. A estos oligonucleótidos se les añadieron secuencias específicas de dianas de restricción en sus extremos 5' que generan extremos cohesivos no compatibles para su posterior inserción en el vector binario pGKO2 (Khang *et al.*, 2006), pudiendo determinar así el sentido de la inserción de las construcciones dentro del vector.

Como marcador de selección positiva se empleó el casete de resistencia a higromicina (*hph*) que incluye el gen de resistencia y el promotor del gen del triptofano C (*trpC*), amplificados a partir del vector pBht2 (Khang *et al.*, 2006) con los oligonucleótidos OJM197 y OJM198.

TABLA 2. Oligonucleótidos para la obtención de las construcciones para disrupción génica

GEN	ID	USO*	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA 5'-3'	T _{HIB} (°C)	AMPLICIÓN (pb)
PdigORF_17907	OJM455	F	Extremo 5' para construcción KO Diana de restricción para XbaI	CC TCTAG AGCGCTTG CTCTCTGCAAC	60	982
	OJM456	R	Extremo 5' para construcción KO Extremo 5' casete HygR	ATGCTCCTT CAATATC AGTTAACGGAACTGA AGTGGCTGTCAAC	62	
	OJM457	F	Extremo 3' para construcción KO Extremo 3' casete HygR	CCGACCGGGA ACCAG TTAACAGCTGGACAG CCGTGAAGC	60	
	OJM458	R	Extremo 3' para construcción KO Diana de restricción para SaI	CC GTGAC TGAACTA TCGTGCCGGTTTG	60	
PDIG_23520	OJM449	F	Extremo 5' para construcción KO Diana de restricción para SpeI	CG ACTAGT GTCTTACT TCTTCATTTGACCG	62	1035
	OJM450	R	Extremo 5' para construcción KO Extremo 5' casete HygR	ATGCTCCTT CAATATC AGTTAACGGGCTCATT GCAGGTGATATTC	62	
	OJM451	F	Extremo 3' para construcción KO Extremo 3' casete HygR	CCGACCGGGA ACCAG TTAACATTGAGTATGA GCTGAATCCTG	60	
	OJM452	R	Extremo 3' para construcción KO Diana de restricción para HindIII	GG AAGCTT CACCAAG TGCACAGTAGAG	62	
PDIG_31210	OJM459	F	Extremo 5' para construcción KO Diana de restricción para SpeI	CA ACTAGT GGCGTCT GATGGAAGGTTG	60	855
	OJM460	R	Extremo 5' para construcción KO Extremo 5' casete HygR	ATGCTCCTT CAATATC AGTTAACGTGTGACT GGGATTTTCATGCC	60	
	OJM461	F	Extremo 3' para construcción KO Extremo 3' casete HygR	CCGACCGGGA ACCAG TTAACAGAGCCTGGA TTAGATCACGC	62	
	OJM462	R	Extremo 3' para construcción KO Diana de restricción para SaI	GT GTGAC ACTGGTC TAGAGAGGACGG	60	
PtpC::hph	OJM197	F	Casete completo de resistencia a higromicina (<i>hph</i>) del vector pBHt2	CGTAACTGATATTGA AGGAGCAT	66	1414
	OJM198	R	Casete completo de resistencia a higromicina (<i>hph</i>) del vector pBHt2	TGTTAACTGGTTCCCG GTCGG	66	

En **rojo** se resaltan las secuencias 5' y 3' del casete de higromicina incluidas en las secuencias de los oligonucleótidos para la PCR de fusión. En **azul** se resaltan las dianas de restricción de los enzimas que se emplearán para las posteriores inserciones dirigidas de las construcciones en el vector binario pGKO2.

*F y R: Forward (directo) y Reverse (reverso).

KO: del inglés *Knock out*

Las amplificaciones de los fragmentos flanqueantes de los genes seleccionados se realizaron con la Taq DNA polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ (Invitrogen 12346-086) en reacciones de 25 µL que incluyeron 2,5 µL del 10X AccuPrime PCR buffer II, 0,5 µL de cada pareja de primers 10 µM, 5

ng de DNA genómico de PHI-26 y 0,5 U de la Taq DNA polimerasa AccuPrime™.

El programa de PCR empleado para la amplificación de los fragmentos consistió en un primer paso de desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 60-65°C 1 min y 68°C 1 min, y una extensión final de 5 min a 68°C.

Las reacciones de PCR de fusión para cada construcción se realizaron en un volumen final de 50 µL, e incluyeron 20 ng de cada uno de los fragmentos flanqueantes de cada construcción y del casete de higromicina (*hph*), 1 U de la Taq DNA polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™, 1 µL de cada oligonucleótido 10 µM y 5 µL del 10X AccuPrime PCR buffer II. El programa para la PCR de fusión fue el siguiente: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C 1 min, 68°C 5 min y una extensión final de 10 min a 68°C.

Todos los fragmentos de PCR obtenidos fueron purificados con el *High Pure PCR product Purification kit* (Roche). La presencia y el tamaño de los amplicones se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.

2.4 Ligación y transformación

Los fragmentos de PCR de fusión purificados se ligaron en el vector *pGEM-T Easy vector system I* (Promega A1360) tal y como se indica en el protocolo del kit, con una relación molar inserto:vector 3:1. Este vector contiene el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

Para la transformación, se mezcló 1 µL de la ligación de cada una de las construcciones con 40 µL de células *E.coli* JM109 electrocompetentes glicerizadas y almacenadas a -80°C. Las células junto con la ligación fueron introducidas en cubetas de electroporación desechables de 2 mm estériles y enfriadas previamente. El protocolo de electroporación fue de un único pulso a 2,5 Kv, 2500 V, 25 µF y 200 Ω. Las células fueron rápidamente transferidas a 960 µL de medio SOC atemperado a 37°C y se agitaron durante 1 hora a 200 rpm. Tras la incubación, las células se sembraron en placas de LB Agar (Pronadisa) con ampicilina (100 µg/mL) que incluían IPTG (0.1 mM) y X-gal (20 ng/mL). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 12 horas. Para cada una de las construcciones se seleccionaron algunas de las colonias blancas obtenidas, que fueron crecidas en 300 µL de medio LB ampicilina (100 µg/mL) durante 5 horas a 37°C y 200 rpm.

2.5 PCR de colonia

Las reacciones de PCR de colonia se realizaron en un volumen final de 25 µL que contenían 2 µL de cultivo, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de los oligonucleótidos OJM197 y OJM198, 0,1 mM de dNTPs y 1,25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen ETAQ500). El protocolo de PCR fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización de 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 2 min, y un ciclo de extensión de 72°C 10 min.

La presencia y el tamaño de los amplicones se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.

Los clones positivos seleccionados se sembraron en medio PDB durante 24 horas a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se extrajeron los plásmidos recombinantes con el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich).

2.6 Secuenciación y digestión de las construcciones obtenidas

La secuenciación de los plásmidos recombinantes fue realizada por el servicio de secuenciación de la Universitat de València (<http://scsie.uv.es/>) a partir de las muestras marcadas con el kit *BigDye Terminator Ready Sequencing vs3.1* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y analizaron con el programa DNAMAN v4.03.

Para la digestión de las construcciones pGEM-TΔ17907 y pGEM-TΔ23520 se emplearon respectivamente los enzimas XbaI-Sall y SpeI-HindIII *FastDigest* (Thermo Scientific), en reacciones de 25 μL con 600 ng de DNA de cada construcción. Paralelamente fueron sometidas a una restricción con el enzima EcoRI *FastDigest* (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37°C y 10 min a 80°C. El resultado de la digestión se visualizó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.

2.7 Ensayos de sensibilidad de distintas cepas de *P. digitatum* frente a péptidos PAF

Los péptidos empleados en este estudio (TABLA 3) fueron sintetizados con una pureza >95 % por la compañía *GenScript Corporation* (Piscataway, EEUU). PAF112 incluye un puente disulfuro uniendo sus dos residuos de cisteína. La actividad inhibitoria de estos péptidos sobre las cepas de *P. digitatum* PHI-26, PDMG672, PDEH515 y PDMG122, así como su posible sinergia fue determinada sobre placas de microtítulo estériles de 96 pocillos (Nunc). Como medio de crecimiento se empleó medio PDB al 5 % con cloranfenicol 0,003 % (w/v). Se trataron $2,5 \times 10^4$ conidios/mL de las cepas analizadas frente a concentraciones crecientes de los péptidos seleccionados (TABLA 3) y frente a una combinación de los mismos. Las placas se incubaron a 24°C durante 3-5 días y se midió la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) a diferentes tiempos de incubación en un espectrómetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Electron).

TABLA 3. Péptidos sintéticos ensayados frente a distintas cepas de *P. digitatum*

PÉPTIDO	SECUENCIA	MW
PAF112	NCGSAANKRAKSDRHHCE	1982
PAF114	GSAANKR	703
PAF115	KSDRHH	779
PAF26	RKKWFW	950

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de las construcciones de DNA para la transformación genética de *P. digitatum* PHI-26

3.1.1 Ubicación de las secuencias tipo AFP y su contexto en el genoma de *P. digitatum*

La localización de las secuencias PdigORF_17907, PDIG_23520 y PDIG_31210 obtenidas a partir de la base de datos del NCBI y sus respectivos análisis de restricción se muestran en la FIGURA 1.

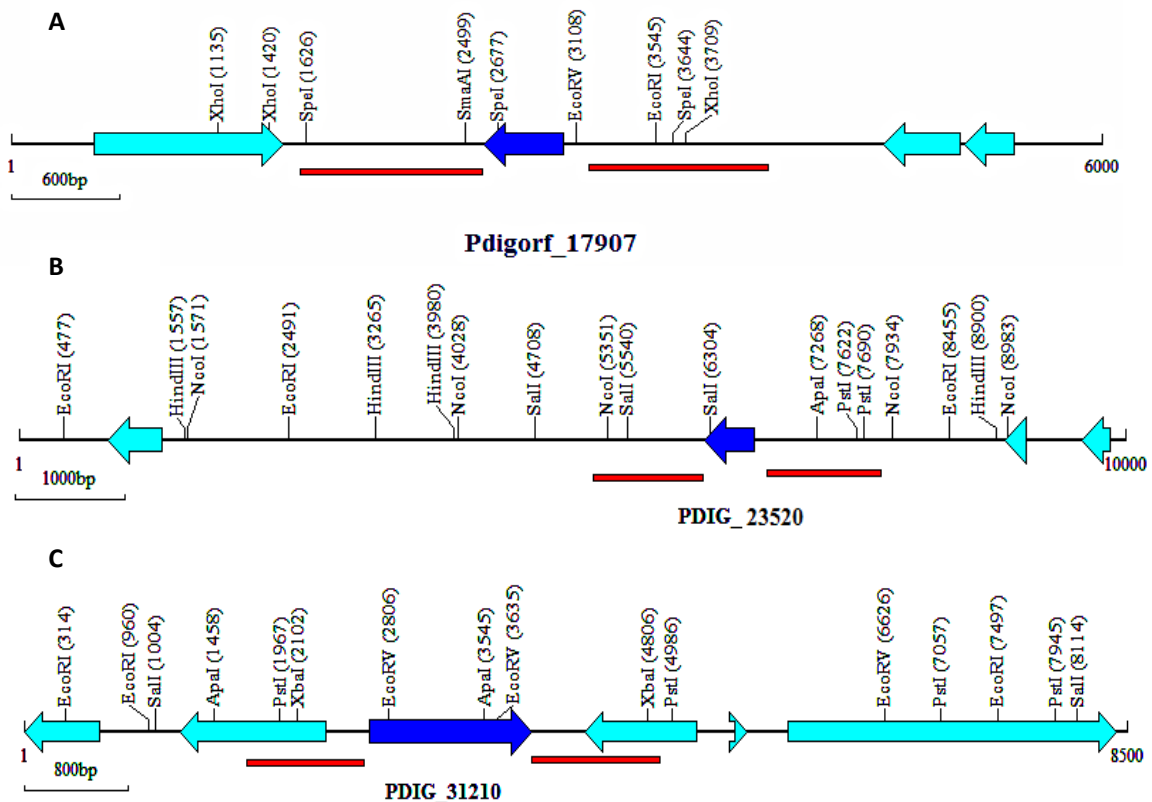


FIGURA 1. Contexto genómico de las secuencias seleccionadas para su interrupción en *P. digitatum*

En **azul oscuro** se representan las secuencias a interrumpir. En **azul claro** se muestran las ORFs adyacentes anotadas en el genoma del hongo y en **rojo** las secuencias flanqueantes en 5' y 3' de las secuencias seleccionadas para la recombinación homóloga. Se muestran también algunas de las dianas de restricción presentes en el vector binario de transformación pGKO2.

Para que el proceso biológico de recombinación homóloga sea efectivo en hongos filamentosos y se puedan obtener mutantes nulos de los genes seleccionados, es necesaria la amplificación por PCR de aproximadamente 1000 pb flanqueantes en 5' y 3' a las secuencias a interrumpir (Szewczyk *et al.*, 2006), que serán las que flanquearán el casete de resistencia a higromicina (*hph*) en las construcciones obtenidas por PCR de fusión y que se encargarán de producir la recombinación homóloga en el hongo.

Dado que el fenotipo que se quiere caracterizar es el debido exclusivamente a la disrupción de los tres genes seleccionados, es importante estudiar las posibles pautas abiertas de lectura (ORFs) que se encuentran en las proximidades de los genes diana, ya que en el caso que haya secuencias anotadas demasiado próximas a las secuencias que se pretende disrumpir, se corre el riesgo de romper la pauta de lectura de las ORFs adyacentes tras el proceso de recombinación homóloga en el hongo.

Como se observa en las secuencias PdigORF_17907 (**FIGURA 1A**) y PDIG_23520 (**FIGURA 1B**), las ORFs anotadas más cercanas (representadas en azul claro) se encuentran a una distancia superior a 1000 pb, por lo que las secuencias flanqueantes a PdigORF_17907 y PDIG_23520 (rojo) son secuencias intergénicas no codificantes, lo que también se ha confirmado con la base de datos MycoCosm, ya que no se ha encontrado en esas regiones homología de secuencia con otras ORFs de otros hongos secuenciados (datos no mostrados). Sin embargo, vemos que para la secuencia PDIG_31210 (**FIGURA 1C**) existen secuencias anotadas en sus proximidades, lo que podría suponer una ruptura de la pauta de lectura de estos genes tras la recombinación y la expresión de un fenotipo resultado de una disrupción multigénica. En este caso, resultará necesaria la secuenciación de estas regiones tras la obtención de los mutantes nulos de *P. digitatum* para confirmar que la pauta de lectura de las ORFs adyacentes se ha mantenido intacta, y poder así asegurar que la caracterización fenotípica del mutante se deberá exclusivamente a la disrupción del gen seleccionado.

3.1.2 Obtención de las construcciones mediante PCR de fusión

Para la obtención de las construcciones de DNA, se siguió el mecanismo de PCR de fusión que se muestra en la **FIGURA 2A**. Inicialmente se amplificaron los fragmentos 5' y 3' flanqueantes (representados en rojo) de los genes a disrumpir con los cebadores diseñados para ello (**TABLA 2**). Obtenidos los fragmentos flanqueantes, éstos se fusionaron con el casete de higromicina amplificado a partir del vector pBHT2 (Khang *et al.*, 2006) (negro y amarillo) empleando los cebadores de los extremos de las construcciones.

La amplificación por PCR de los fragmentos flanqueantes de los genes seleccionados así como los resultados de su fusión con el casete de resistencia a higromicina se pueden ver en la **FIGURA 2B**.

En todos los casos se observa que los tamaños obtenidos para los fragmentos flanqueantes en 5' y 3' son los esperados, así como para los amplicones resultantes de la PCR de fusión, obteniendo construcciones de unas 3400 pb para la disrupción de los genes PdigORF_17907 y PDIG_23520 y de 3000 pb para la disrupción de PDIG_31210. Sin embargo, se distingue una banda inespecífica de unas 1100 pb en la PCR de fusión de esta última construcción (señalizada con una flecha amarilla), que no se corresponde con el tamaño esperado de 3000 pb ni con el tamaño de los fragmentos flanqueantes en 5' y 3' del gen PDIG_31210 ni tampoco con el casete de higromicina. Este segundo amplicón puede influir en el rendimiento de clonaje de la construcción de interés en el vector pGEM-T Easy, ya que parte del DNA ligado corresponderá con la construcción de interés y parte con este fragmento inespecífico, por lo que se ha tenido en cuenta para su posterior confirmación por PCR y secuenciación.

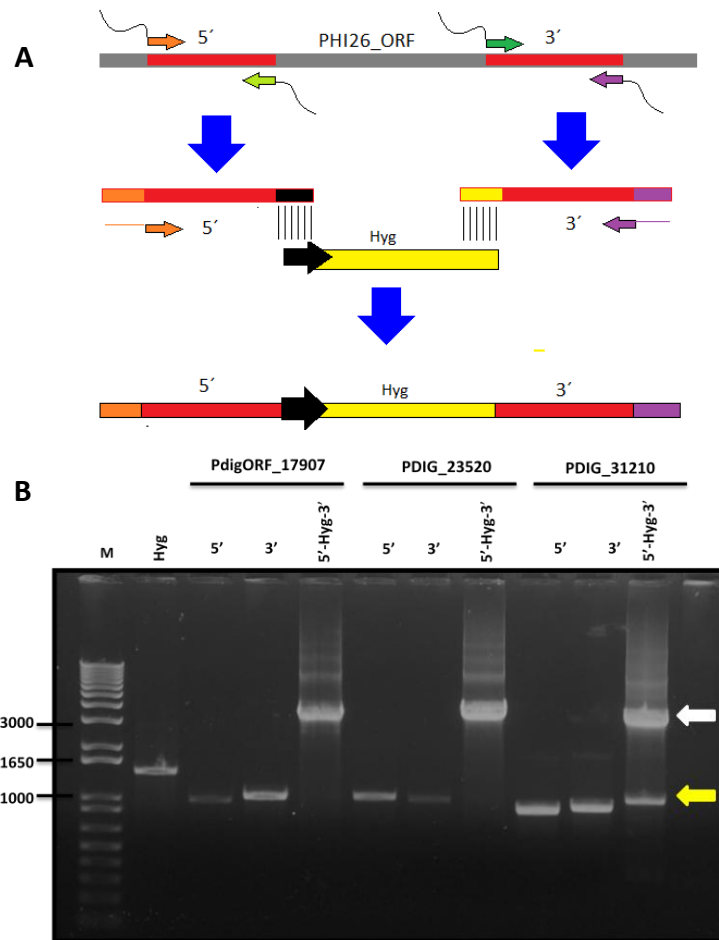


FIGURA 2. PCR de fusión

Procedimiento seguido para la obtención de las construcciones de DNA para disrupción (A). En rojo se muestran las secuencias flanqueantes de los genes diana. En amarillo se representa el gen de higromicina junto con su promotor representado en negro. Las líneas negras representan las zonas complementarias entre las secuencias flanqueantes y el casete de higromicina para su fusión.

(B) Visualización de los fragmentos obtenidos por PCR y PCR de fusión. La flecha blanca representa las bandas de alto peso molecular correspondientes a las construcciones tras la PCR de fusión. La flecha amarilla representa una banda inespecífica.

M: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Life technologies)

3.1.3 Análisis y selección de los clones de *E.coli* transformantes positivos

El vector de clonación pGEM-T Easy contiene en su sitio de clonaje múltiple (MSC) o *polilinker* la pauta de lectura del gen *lac z*, el cual codifica el enzima β -galactosidasa. En presencia en el medio del compuesto orgánico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) este enzima es capaz de descomponerlo produciendo dos compuestos: galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol. Este último es fácilmente oxidable produciendo un compuesto azul insoluble, dando una apariencia azulada a las colonias bacterianas que poseen el enzima activo. Sin embargo, las colonias que hayan incorporado el plásmido recombinante no se tornarán de apariencia azulada, manteniendo su color blanco característico, ya que la construcción insertada en la zona del *polilinker* habrá roto la paula de lectura del gen *lac z*, evitando su expresión.

Tras la ligación de las construcciones obtenidas por PCR de fusión en el vector pGEM-T Easy, las células de *E.coli* JM109 se transformaron e incubaron en presencia de ampicilina, X-gal e IPTG, inductor de la actividad β -galactosidasa. Tras un cribado visual de las placas, aquellas colonias que mostraron una coloración blanca característica fueron sometidas a una PCR de colonia, cuyos resultados se muestran en la **FIGURA 3**.

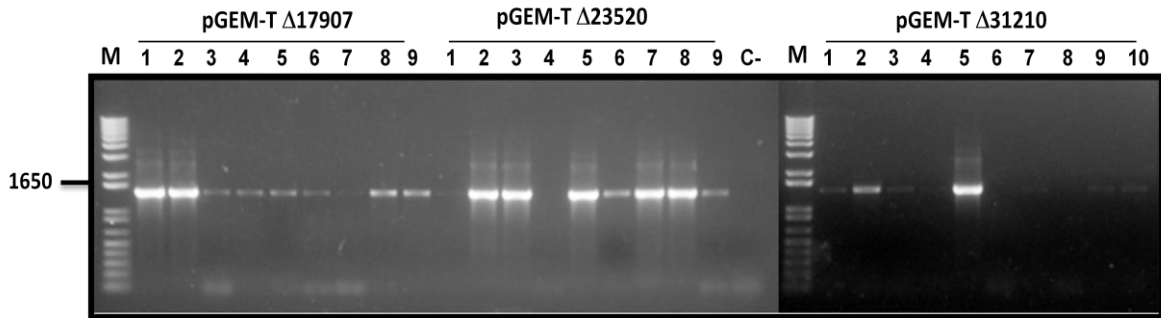


FIGURA 3. PCR de colonia de los clones de *E.coli* JM109 recombinantes
M: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Life technologies)

Se seleccionaron nueve colonias blancas provenientes del cultivo transformante para la construcción pGEM-T Δ 17907, nueve para la construcción pGEM-T Δ 23520 y diez para la pGEM-T Δ 31210. Dado que las construcciones diseñadas poseen en su zona central el casete de resistencia a higromicina de 1,4 kb, se seleccionaron los oligonucleótidos OJM197 y OJM198 para su amplificación en las colonias recombinantes. Además, este tamaño permite distinguir los clones transformantes para la construcción pGEM-T Δ 31210 de aquellos clones que hayan incorporado el plásmido con el inserto inespecífico de 1,1 kb aproximadamente que se observó tras la PCR de fusión (**FIGURA 2B**).

Como puede observarse en la **FIGURA 3**, todas las colonias seleccionadas para la construcción pGEM-T Δ 17907 fueron recombinantes, obteniéndose la banda ampificada correspondiente al casete de higromicina de 1,4 kb, mientras que para la construcción pGEM-T Δ 23520 se obtuvieron 8 recombinantes de un total de 9 colonias seleccionadas y 7 de un total de 10 para la construcción pGEM-T Δ 31210. Vemos por tanto que la eficiencia de clonaje en el vector pGEM-T Easy es elevada, sin embargo no todas las colonias blancas resultaron finalmente ser colonias recombinantes positivas en nuestras construcciones de interés. Este fenómeno podría deberse a que en algunas de las colonias blanquecinas no se hubiera expresado con mucha intensidad el enzima β -galactosidasa, por lo que el precipitado azulado fuera inapreciable, dando lugar a falsos positivos. Por otro lado, colonias recombinantes en fragmentos que no se corresponderían con nuestras construcciones de interés (otras moléculas residuales de DNA, amplicones inespecíficos o fragmentos truncados) también podrían haber dado lugar a colonias blancas pero negativas en la PCR de colonia con los oligonucleótidos seleccionados.

Las diferencias de intensidad de banda podrían deberse a diferencias en la biomasa de microorganismos sembrados previamente a la PCR de colonia. Errores de manipulación en las cantidades de reactivos de PCR también podrían dar lugar a diferencias de intensidad de amplificación entre clones.

Finalmente se seleccionó un clon recombinante positivo para cada una de las tres construcciones que presentara una banda de alta intensidad para confirmar la integridad de su secuencia mediante secuenciación. Los clones seleccionados fueron el clon 2 para la construcción pGEM-T Δ 17907, el clon 2 para pGEM-T Δ 23520 y el clon 5 para pGEM-T Δ 31210.

3.1.4 Caracterización de las construcciones génicas por secuenciación y digestión

La región de clonaje múltiple del vector pGEM-T Easy está flanqueada por las secuencias promotoras de las RNA polimerasas de los bacteriófagos T7 y SP6, por lo que para la secuenciación de las construcciones obtenidas se emplearon oligonucleótidos específicos de estas secuencias que ya habían sido sintetizados previamente en el laboratorio: OJM380 (T7) y OJM381 (SP6). Adicionalmente, y dado que el tamaño de las construcciones es superior a 3 kb, se emplearon dos oligonucleótidos internos al casete de higromicina (OJM231 y OJM232) para obtener fragmentos solapantes que posteriormente pudieran ensamblarse. Los resultados tras el ensamblaje de las secuencias obtenidas se muestran en la **FIGURA 4**.

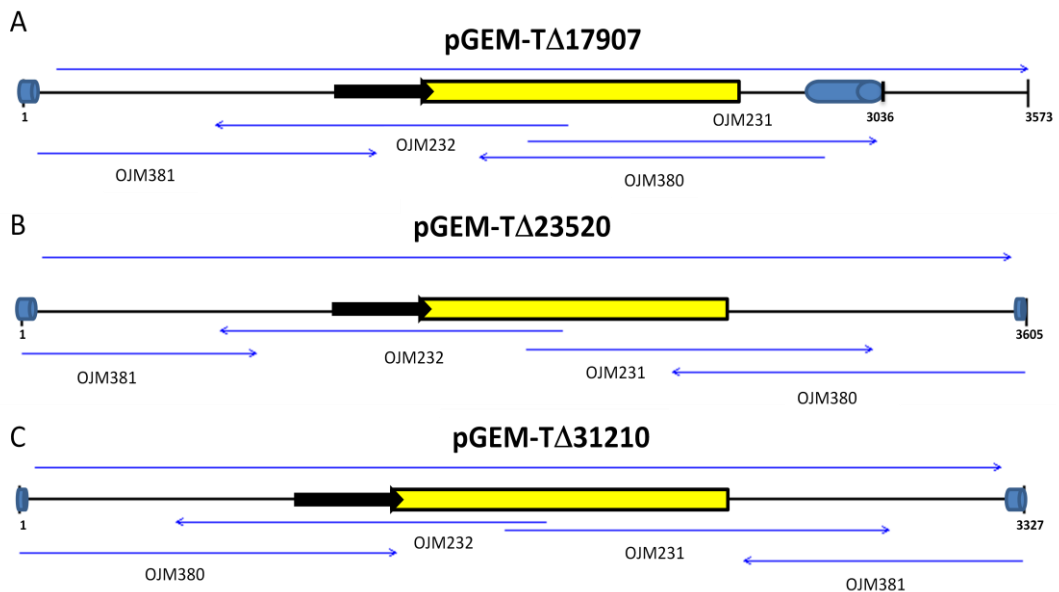


FIGURA 4. Ensamblajes de las construcciones pGEM-T Δ 17907 (A), pGEM-T Δ 23520 (B) y pGEM-T Δ 31210 (C) obtenidos tras su secuenciación

En amarillo se representa la secuencia del gen de resistencia a higromicina precedido por su promotor representado en negro. Las secuencias del vector pGEM-T Easy se representan en azul. La secuencia teórica está representada por la flecha azul de mayor longitud arriba de las construcciones. Los fragmentos aguas arriba y aguas abajo del casete de higromicina se corresponden con los fragmentos 5' y 3' de las construcciones respectivamente.

Como se observa en la **FIGURA 4B** y **4C**, los ensamblajes obtenidos para esas construcciones fueron los esperados. Tras la comparación de las secuencias consenso obtenidas con las secuencias teóricas, se comprobó que la secuencia de la construcción pGEM-T Δ 23520 coincidía al 100 % con su secuencia teórica.

Sin embargo, en la construcción pGEM-T Δ 31210 se observaron dos cambios nucleotídicos; un cambio de timina a citosina en la posición 751, fuera del casete de higromicina, y otro cambio de timina a citosina en la posición 2026, interna al casete. Ambos cambios fueron corroborados con el análisis de los cromatogramas. Estos cambios pueden haberse producido durante la amplificación de los fragmentos por PCR o PCR de fusión, y pueden presentar varios problemas tras la obtención de los mutantes nulos. Por una parte, el cambio producido dentro del casete de higromicina puede provocar la pérdida de funcionalidad de la resistencia y por tanto la imposibilidad de seleccionar a los mutantes tras su transformación. Por otro lado, y dado que el gen PDIG_31210 contiene en sus proximidades genómicas ORFs anotadas (FIGURA 1), este cambio podría resultar en una mutación puntual dentro de estas regiones tras la recombinación homóloga, lo que podría provocar su pérdida de función.

Tras el análisis de las mutaciones, se observó que el cambio en la posición 751 se encuentra en una región intergénica, no afectando a los genes adyacentes, mientras que la mutación de la posición 2026 produce un cambio del aminoácido Tirosina a Histidina. Desconocemos si este cambio afecta a la expresión de resistencia y por tanto se descarta este clon para su clonación en el vector pGKO2 y la obtención de mutantes nulos de *P. digitatum* en futuros experimentos del grupo.

Por otro lado, el ensamblaje de la construcción pGEMT- Δ 17907 revela el clonaje de una construcción parcial. Como se observa en la FIGURA 4A, el fragmento 3' de la construcción tiene un tamaño mucho menor a las 1029 pb esperadas, habiéndose secuenciado una mayor región del vector pGEM-T Easy.

La ausencia de parte del fragmento 3' fué confirmada con una posterior digestión (FIGURA 5).

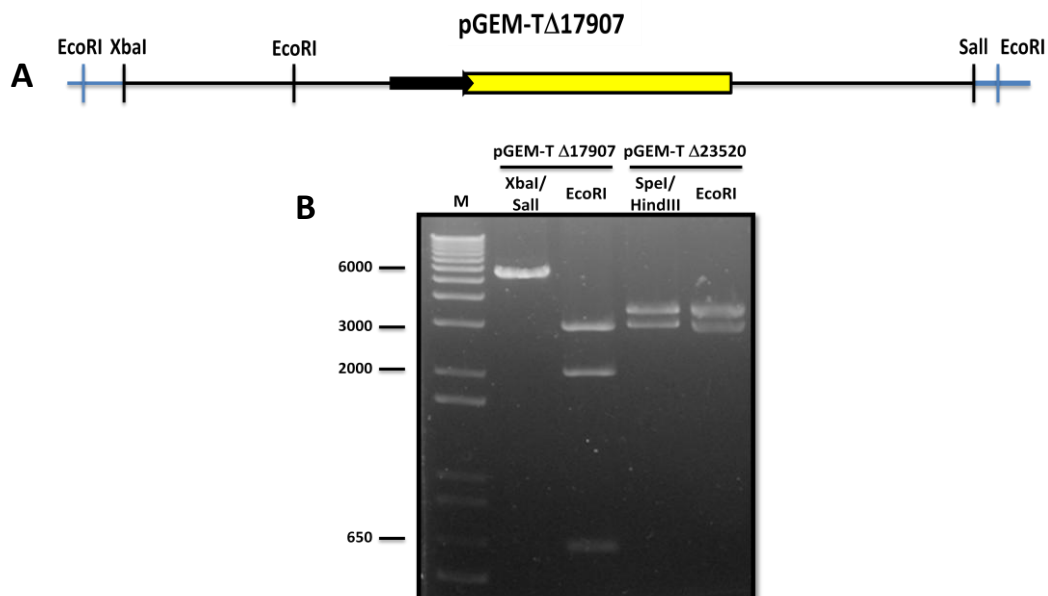


FIGURA 5. Digestión de las construcciones pGEM-T Δ 17907 y pGEM-T Δ 23520

(A) Ubicación de las dianas de restricción EcoRI, XbaI y Sall en la construcción pGEM-T Δ 17907 insertada dentro del vector (representado en azul). En amarillo se representa el gen de higromicina precedido de su promotor (negro). (B) Resultados tras la digestión de la construcción pGEM-T Δ 17907 y de la construcción pGEM-T Δ 23520 empleada como control.

M: marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Life technologies)

La construcción pGEM-T Δ 17907 presenta en su extremo 5' las secuencias de restricción EcoRI y XbaI (**FIGURA 5A**) mientras que en su extremo 3' se le ha añadido la secuencia de restricción Sall. Al realizar la digestión con los enzimas XbaI/Sall, se esperaba obtener dos bandas en el gel de electroforesis; una banda correspondiente al vector linealizado de 3015 pb sin el inserto y otra correspondiente al inserto de unas 3400 pb separado del vector. Sin embargo, se ha obtenido una única banda de un tamaño inferior a 6000 pb, confirmándose la ausencia de parte de la secuencia 3' de la construcción. Adicionalmente, la banda de un tamaño menor a 6000 pb confirma una construcción de secuencia más corta a lo esperado (6400 pb). La presencia del extremo 5' en la construcción fue confirmada con la digestión en presencia del enzima EcoRI, obteniéndose una banda correspondiente al vector linealizado sin el inserto (3015 pb) más dos bandas correspondiéndose a la digestión del extremo 5' de la construcción, una de 650 pb y otra de un tamaño de 2000 pb, un tamaño menor al esperado para la construcción completa (2750 pb).

El clonaje de una construcción de tamaño menor al esperado tras su confirmación previa mediante electroforesis es un fenómeno inusual. El tamaño obtenido tanto para el fragmento 3' flanqueante como para la PCR de fusión (**FIGURA 2B**) confirman el tamaño adecuado de la construcción. Sin embargo, estos tamaños no coinciden con los resultados tras la secuenciación. Tal vez el inserto clonado provenga de un fragmento de DNA truncado por su manipulación tras la PCR de fusión. Sin embargo, es un fenómeno poco común cuyas causas reales se desconocen.

Como control de los resultados de la secuenciación, se incluyó la digestión de la construcción pGEMT- Δ 23520 con los enzimas SpeI/HindIII y una digestión paralela con el enzima EcoRI (**FIGURA 5B**). La digestión con los enzimas SpeI/HindIII produjo la liberación del inserto de 3,4 kb y la linealización del vector (3015 pb), al igual que ocurrió con el enzima EcoRI, cuya secuencia se situaba en dos puntos cercanos a la zona de clonaje dentro del pGEM-T Easy.

3.2 Estudio de la actividad inhibitoria de péptidos antifúngicos

3.2.1 Sensibilidad de cepas mutantes de *P. digitatum* frente a péptidos antifúngicos

PAF112 es un péptido sintético de 19 aminoácidos y de estructura cerrada por un puente disulfuro cuya secuencia proviene de la secuencia de aminoácidos de la proteína PDIG_68840 (**TABLA 3**). La localización de PAF112 dentro de la proteína se muestra en la **FIGURA 6**.

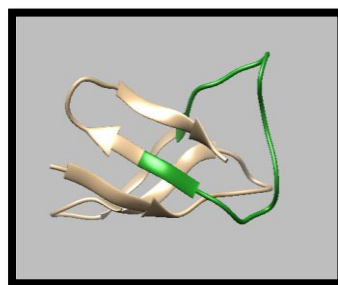


FIGURA 6. Modelo molecular de la proteína PDIG_68840 de *P. digitatum*
En verde se muestra la localización de la secuencia del péptido PAF112 dentro de la proteína

La actividad antifúngica de PAF112 frente a *P. digitatum* PHI-26 ya ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo en ensayos anteriores (datos no mostrados), presentando una actividad antimicrobiana un orden de magnitud por debajo a la descrita para el péptido sintético PAF26 (Lopez-Garcia *et al.*, 2002). En este trabajo se ha caracterizado la actividad antifúngica de PAF112 y PAF26 frente a distintas cepas mutantes de *P. digitatum* (PDMG672, PDMG122 y PDEH515), utilizando la cepa parental *P. digitatum* PHI-26 como control.

Los resultados de los ensayos de inhibición (**FIGURA 7**) confirman el mayor potencial antifúngico de PAF26 frente a PAF112 para todas las cepas ensayadas. La cepa PDMG122 mutante en el gen PDIG_68840 tiene un comportamiento prácticamente idéntico al de la cepa parental frente a ambos péptidos, lo que demuestra que la ausencia del gen que codificaría una posible proteína AFP en *P. digitatum* no parece afectar a la resistencia a péptidos antimicrobianos en el hongo, indicando que dicho gen no está implicado en la interacción entre el hongo y los péptidos.

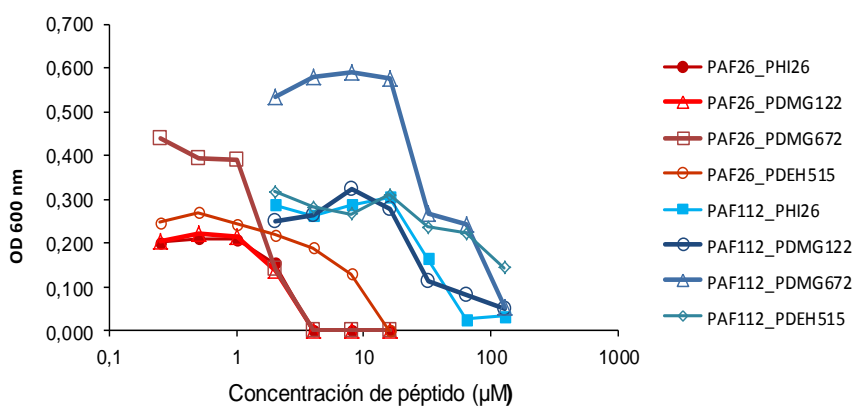


FIGURA 7. Curvas dosis-respuesta de los péptidos PAF26 y PAF112 frente a distintas cepas de *P. digitatum*. En rojo se representan las curvas de PAF26; en azul las curvas correspondientes a PAF112. Se representan los valores medios de densidad óptica (OD600) para cada concentración de péptido tras 72 horas de incubación a 24°C.

La cepa PDMG672, mutante en un gen implicado en la biosíntesis de quitina (quitín sintasa VII), tampoco presenta un fenotipo diferencial para el péptido PAF26 a concentraciones inhibitorias con respecto a PHI-26, aunque sí se observa un mayor crecimiento en presencia de PAF112 en comparación con la cepa control, sobre todo a las concentraciones de 32 y 64 µM de dicho péptido.

Una posible explicación para esta ligera disminución de la sensibilidad de PDMG672 frente a PAF112 podría deberse a la remodelación de la pared celular que sufre el mutante producto de la inducción de la expresión génica de otras quitín sintasas presentes en el hongo (Gandía *et al.*, 2014), resultando en una cepa con altos niveles de quitina que impedirían al péptido antifúngico, a pesar de su carga catiónica, actuar a nivel de pared y afectar su integridad.

El hecho de que una misma cepa presente diferente patrón de sensibilidad frente a dos péptidos antimicrobianos distintivos (PAF26 y PAF112 en este caso) podría indicar que ambos péptidos poseen modos de acción diferenciales. Si esto se confirma, PAF112 se diferenciaría del modo de acción de PAF26, el cual, aunque necesita de una pared celular funcional para interactuar con el

hongo, desarrolla su acción fungicida desde el interior de la célula (Harries *et al.*, 2013) (Muñoz *et al.*, 2013).

Adicionalmente se describe la mayor resistencia de la cepa PDEH515 mutante en un gen implicado en la O-glicosilación de proteínas (PMT2) frente a PAF26 y PAF112. Se observa como las concentraciones mínimas inhibitorias de estos péptidos para el resto de cepas mutantes analizadas fueron del orden de 4 μM de PAF26 y 64-128 μM de PAF112, mientras que en PDEH515 resultaron ser mayores (**FIGURA 7**). Estos resultados confirman la importancia de la glicosilación de proteínas en la sensibilidad del hongo a péptidos antifúngicos.

3.2.2 Estudio de la interacción sinérgica entre PAF26 y PAF112

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio revelaron una interacción sinérgica positiva estadísticamente significativa entre los péptidos PAF26 y PAF112 (datos no mostrados). Estos resultados sugirieron un posible mecanismo de acción diferencial entre ambos péptidos que podrían complementarse para aumentar su actividad antimicrobiana. Esta hipótesis es además consistente con los resultados de sensibilidad obtenidos con la cepa PDMG672 (ver apartado 3.2.1 de Resultados).

La secuencia de PAF112 contiene 19 aminoácidos que formarían el lazo catiónico expuesto de mayor tamaño en su proteína de origen (**FIGURA 6**), y que ha mostrado ser de todas las secuencias derivadas de esta proteína, la única con actividad antimicrobiana frente a *P. digitatum* PHI-26 (datos no mostrados).

Para caracterizar mejor la posible interacción entre PAF26 y PAF112, se realizaron varios ensayos en placas de microtítulo con concentraciones constantes no inhibitorias de PAF26 y concentraciones crecientes de PAF112, PAF114 y PAF115, siendo estos últimos subpéptidos procedentes de la secuencia de PAF112 (**TABLA 3**). Con ello se estudió qué fragmento del lazo catiónico era el necesario para su interacción con PAF26. Los resultados se muestran en la **FIGURA 8**.

De los tres péptidos derivados de la secuencia de PDIG_68840, PAF112, PAF114 y PAF115, vemos que únicamente PAF112 muestra actividad antimicrobiana (débil) por sí solo frente a *P. digitatum* PHI-26. Si comparamos la actividad antifúngica que presenta PAF112 en ausencia de PAF26, con la que presenta en su presencia a concentraciones constantes no inhibitorias del mismo (0,5, 1 y 2 μM), observamos una disminución e incluso inhibición del crecimiento del hongo para las concentraciones de PAF112 no inhibitorias de 16, 32 e incluso 64 μM en presencia de PAF26 a 2 μM (**FIGURA 8A**), obteniendo unas desviaciones estándar para estos valores medios de OD₆₀₀ no solapantes entre sí para estas concentraciones (**FIGURA 8B**). Esta interacción sinérgica entre ambos péptidos, aunque débilmente mostrada en este experimento, refuerza la hipótesis de que ambos péptidos poseen diferentes modos de acción que se complementarían para aumentar su acción antifúngica.

En ningún caso ha resultado inhibitoria la combinación de PAF26 a las concentraciones ensayadas con los péptidos PAF114 y PAF115 (**FIGURA 8A y 8B**) por lo que se concluye que para que exista interacción con PAF26, se necesita la secuencia completa del lazo catiónico expuesto de la proteína PDIG_68840 recogida en el péptido sintético PAF112, no pudiendo establecerse ningún tipo de interacción inhibitoria con fragmentos de menor tamaño derivados de esta secuencia.

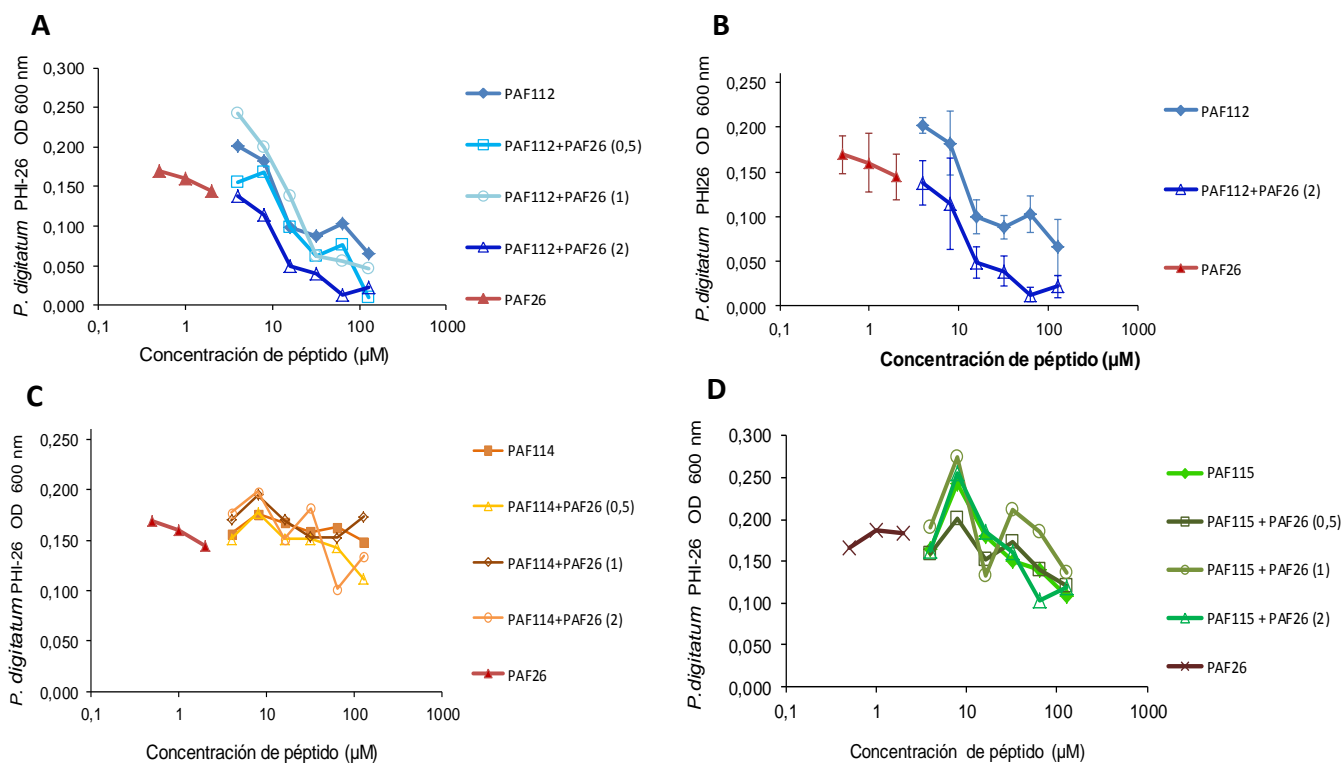


FIGURA 8. Curvas dosis-respuestas de la interacción de PAF26 con los péptidos PAF derivados de la proteína PDIG_68840 de *P. digitatum*

Se representa el valor medio de OD₆₀₀ para cada valor de concentración de los péptidos PAF26 y PAF112 (A) y sus desviaciones estándar (B); el valor medio de la OD₆₀₀ para PAF26 y PAF114 (C) y para PAF26 y PAF115 (D). La concentración de PAF26 (μM) se muestra entre paréntesis. En todos los casos *P. digitatum* PHI-26 fue incubado durante 72 horas a 24°C.

4 CONCLUSIONES

- Se ha abordado el diseño y obtención de construcciones de DNA para la generación de mutantes nulos de *P. digitatum* de los genes PdigORF_17907, PDIG_23520 y PDIG_31210 que codifican proteínas del tipo AFP.
- Los resultados de secuenciación revelan que la construcción obtenida para la disrupción del gen PdigORF_17907 presenta un tamaño menor al esperado y la del gen PDIG_31210 presenta un cambio de secuencia en el marcador de resistencia de consecuencias desconocidas, por lo que ambas han sido finalmente descartadas.
- La construcción para la disrupción del gen PDIG_23520 se utilizará en el proceso de transformación genética de *P. digitatum*. Esta construcción será posteriormente clonada en el vector binario de transformación pGKO2.
- Se ha confirmado la mayor resistencia de la cepa PDEH515, mutante en el gen de glicosilación de proteínas *pmt2*, frente a dos péptidos antifúngicos distintos (PAF26 y PAF112) y en menor medida de la cepa PDMG672, mutante en el gen de biosíntesis de quitina *chsVII*, frente al péptido PAF112.
- La cepa PDMG122 mutante en el gen del tipo AFP PDIG_68840 no presenta sensibilidad diferencial frente a péptidos antifúngicos.

- Los ensayos con los péptidos PAF26 y PAF112 revelan la necesidad de la secuencia completa de este último péptido para que ocurra la interacción sinérgica positiva de ambos. Esto permite conocer mejor el funcionamiento de esta interacción y en un futuro desarrollar tratamientos conjuntos que mejoren la calidad y conservación postcosecha de frutos cítricos.

5 AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Mónica Gandía, Jose F. Marcos y a Cristina Font por toda la ayuda recibida durante la realización de este trabajo, el cual ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) bajo la referencia BIO2012-34381.

6 REFERENCIAS

- Batta, G., T. Barna, et al. (2009). "Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - A highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*." The FEBS Journal 276(10): 2875-2890.
- Brooks, G. T. and T. Roberts (1999). Pesticide chemistry and bioscience: the food-environment challenge, Elsevier.
- Campos-Olivas, R., M. Bruix, et al. (1995). "NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism." Biochemistry 34(9): 3009-3021.
- FAO: Prevention of post-harvest food losses: food, vegetables and root crops - a training manual, FAO Training series. vol. 17. Rome: FAO;1989. Dirección URL <<http://www.fao.org/docrep/t0073e/t0073e00.HTM>>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) [en línea]. Dirección URL: <<http://faostat3.fao.org>>. [Consulta: 29 Jun. 2014]
- Galgóczy, L., L. Kovács, et al. (2010). Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. Current Research, Technology and Education Topics in Applied and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Vila, Formatex: 550-559.
- Gandía, M., E. Harries, et al. (2014). "The myosin motor domain-containing chitin synthase PdChsVII is required for development, cell wall integrity and virulence in the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*." Fungal Genetics and Biology 67(0): 58-70.
- Gentsch, M. and W. Tanner (1996). "The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital." Embo J 15(21): 5752-5759.
- Gun Lee, D., S. Y. Shin, et al. (1999). "Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*." Biochem Biophys Res Commun 263(3): 646-651.
- Hancock, R. E. W. and H. G. Sahl (2006). "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies." Nature Biotechnology 24(12): 1551-1557.
- Harries, E., L. Carmona, et al. (2013). "Genes involved in protein glycosylation determine the activity and cell internalization of the antifungal peptide PAF26 in *Saccharomyces cerevisiae*." Fungal Genet Biol 58-59: 105-115.
- Hegedus, N., C. Sigl, et al. (2011). "The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*." Journal of Basic Microbiology 51(3): 253-262.

- Holmes, G. J. and J. W. Eckert (1999). "Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest Citrus Fungicides in California." Phytopathology 89(9): 716-721.
- Khang, C. H., S. Y. Park, et al. (2006). "Filamentous Fungi (Magnaporthe grisea and Fusarium oxysporum)." Methods Mol Biol 344: 403-420.
- Knight, S. C., V. M. Anthony, et al. (1997). "Rationale and perspectives on the development of fungicides." Annu Rev Phytopathol 35: 349-372.
- Lopez-Garcia, B., L. Gonzalez-Candelas, et al. (2000). "Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits." Mol Plant Microbe Interact 13(8): 837-846.
- Lopez-Garcia, B., E. Perez-Paya, et al. (2002). "Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library." Appl Environ Microbiol 68(5): 2453-2460.
- Marcet-Houben, M., A.-R. Ballester, et al. (2012). "Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus." BMC Genomics 13(1): 646.
- Marcos, J. F., A. Muñoz, et al. (2008). "Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection." Annual Review of Phytopathology 46: 273-301.
- Marx, F., U. Binder, et al. (2008). "The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies." Cell Mol Life Sci 65(3): 445-454.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [en línea]. Dirección URL: <[http:// www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)>. [Consulta: 30 Jun. 2014]
- Muñoz, A., M. Gandía, et al. (2013). "Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model." Fungal Biology Reviews 26(4): 146-155.
- Nordberg, H., M. Cantor, et al. (2014). "The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates." Nucleic Acids Res 42(Database issue): 12.
- Rodríguez-Martín, A., R. Acosta, et al. (2010). "Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*." Peptides 31(4): 541-547.
- Skouri-Gargouri, H. and A. Gargouri (2008). "First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*." Peptides 29(11): 1871-1877.
- Skouri-Gargouri, H., N. Jellouli-Chaker, et al. (2010). "Factors affecting production and stability of the AcAFP antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*." Appl Microbiol Biotechnol 86(2): 535-543.
- Szewczyk, E., T. Nayak, et al. (2006). "Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*." Nat Protoc 1(6): 3111-3120.
- Tuset, J. (1987). "Podredumbres de los frutos cítricos". Generalitat Valenciana, Conselleria d'agricultura i Pesca.
- Wang, J. Y. and H. Y. Li (2008). "Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*." J Zhejiang Univ Sci B 9(10): 823-828.
- Yang, C., C. Hamel, et al. (2011). "Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms." ISRN Ecology 2011: 1-8