



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS (265D)

“Identificación y caracterización funcional de genes *PMT* relacionados con la glicosilación de proteínas en el hongo patógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*”

Trabajo presentado por **Eleonora del Milagro Harries** para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valencia.

Director Dr. Jose F. Marcos López

Tutor Dr. Jose Vicente Gil Ponce

El Doctor D. Jose Fco. Marcos López, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Departamento de Ciencia de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA):

CERTIFICA: Que D^a. Eleonora del Milagro Harries, Ingeniera Agrónoma por la Universidad Nacional de Salta, Argentina, ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con el título **“Identificación y caracterización funcional de genes *PMT* relacionados con la glicosilación de proteínas en el hongo patógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*”**, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Burjassot, a 28 de Febrero de 2013.

Dr. Jose Fco. Marcos López

Investigador Científico CSIC



El Doctor D. Jose Vicente Gil Ponce, Profesor Titular de la Universidad de Valencia:

CERTIFICA: Que D^a. Eleonora del Milagro Harries, Ingeniera Agrónoma por la Universidad Nacional de Salta, Argentina, ha realizado bajo su tutela el trabajo que, con el título **"Identificación y caracterización funcional de genes *PMT* relacionados con la glicosilación de proteínas en el hongo patógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*"**, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Burjassot, a 28 de Febrero de 2013.

Dr. Jose Vicente Gil Ponce

Profesor Titular Universidad de Valencia

Esta tesis esta dedicada a la memoria de mi cochichi Gerardo Rafael Palavecino y de mi mami Noemí del Carmen Burgos.

Los llevo conmigo siempre y los amo hasta el infinito y más allá... Soy lo que soy gracias a todo el amor incondicional que me brindaron.

*"Llevo tu corazón conmigo
(lo llevo en mi corazón)
nunca estoy sin él
(tú vas dondequiera que yo voy, amor mío;
y todo lo que hago por mí misma
lo haces tú también, amado mío)..."*

*He aquí el más profundo secreto que nadie conoce
(he aquí la raíz de la raíz y el brote del brote
y el cielo del cielo de un árbol llamado vida;
que crece más alto de lo que un alma puede esperar
o una mente puede ocultar)
y ésta es la maravilla que mantiene a las estrellas separadas."*

*Llevo tu corazón (lo llevo en mi corazón).
Edward Estlin Cummings (1894 -1962) Poeta y dramaturgo estadounidense.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer especialmente a mi director de tesis, el Dr. Jose F. Marcos por haberme dado esta gran oportunidad de venir de Argentina para unirme a su grupo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), y sumergirme con su excelente guía en este mundo de biología molecular. También me gustaría dar un enorme gracias a las chicas del grupo: Dra. Mónica Gandía, Dra. Lourdes Carmona y M^a Jose Pascual por su compañerismo y toda la colaboración que me brindaron en la realización de los "megaexperimentos" en estos 4 años.

Además, me gustaría agradecer al Dr. Nick Read por haberme aceptado "temporalmente" como parte de su grupo durante las dos estancias de 4 meses en total que hice en el Institute of Fungal Cell Biology (Universidad de Edimburgo, Reino Unido), y dentro de su grupo agradecer al Dr. Alberto Muñoz por su gran ayuda y colaboración con las técnicas de microscopía confocal láser y al Dr. Adokiye Berepiki por las técnicas de genética molecular de levadura.

También quisiera agradecer al Dr. Luis González Candelas (IATA, Valencia) por toda su colaboración, y a él y Mario López Pérez por su ayuda con los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y con la obtención de la biblioteca genómica del hongo. A los Dres. Leandro Peña y Berta Alquézar (IVIA, Valencia) por proporcionarnos la cepa de *A. tumefaciens* (AGL1), al Dr. Jose Luis Guillamón (IATA, Valencia) por el plásmido pGREG505, al Dr. Seogchan Kang (The Pennsylvania State University, Pennsylvania, EE.UU.) por los plásmidos pGKO2 y pBHt2 y al Dr. Arthur F. J. Ram (Universidad de Leiden, Holanda) por el plásmido pTAS5. A la Unidad Genómica del Servicio Central de Soporte de la Investigación Experimental (SCSIE, Universidad de Valencia) por la secuenciación de DNA. A la explotación comercial de cítricos Cooperativa Vinícola Llíria (Llíria, Valencia) y a Luis Giménez por habernos proporcionado los frutos de naranjas para la realización de los bioensayos.

A los evaluadores de esta memoria, por haber contribuído con sus sugerencias a la corrección y mejora de este documento.

Este trabajo se ha realizado en el Grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del Departamento de Ciencia de los Alimentos del IATA (Valencia). Estoy sumamente agradecida al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y a la co-financiación del Fondo Social Europeo por haberme asignado la beca predoctoral JAE Pre-Doc, y también por la financiación de las estancias en la Universidad de Edimburgo. Agradezco también la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) del gobierno español por los proyectos BIO2006-09523 y BIO2009-12919-C02-01, y de la Generalitat Valenciana por los proyectos ACOMP2009-080, ACOMP2011-258, ACOMP2012-018 y PROMETEO2010-010. Mi formación doctoral se ha realizado dentro del Programa de doctorado del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Valencia. Quiero agradecer especialmente a mi tutor de doctorado Dr. Jose Vicente Gil Ponce por haberme asesorado y ayudado siempre ante cualquier consulta.

En estos 4 años han pasado muchísimas cosas, buenas y malas, tristes y alegres, gracias a Dios, que a pesar de haberme puesto en el camino pruebas muy duras de aceptar, también hizo que gente maravillosa me rodeara acá en Valencia. Es por ello, que quisiera dar un enorme gracias a todos los que forman ó formaron parte del IATA. A Jose por aconsejarme y comprenderme en todo este tiempo. A Luis por su predisposición en enseñar y ayudar siempre. A Tere por sus cálidas palabras de acompañamiento. A M^a Jesús y Lorenzo por los gratos momentos compartidos. Gracias a mis compañeros que estuvieron en mí día a día como a Moni por sus consejos y compañía, al Paco por darme ánimo siempre, a Pili por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del IATA. A los que están como Ana Rosa, Cristina, Sandra, Enri, Joanna, Ana I. y Amparo ó los que pasaron como Mario, Arantxa, Mauro, Hanna, entre otros muchos más, por los lindos momentos.

A mi M^a Jose, que has sido como una mami para mí, me has ayudado a sacar fuerza para seguir adelante cuando me desmoronaba, gracias por todo tu cariño, te quiero un montonazo. A mis amigas del doctorado, Rossana y Laura por las graciosas historietas de las tres supernenas, por haberme acompañado y escuchado en los momentos de dolor y por haber estado ahí animándome, las

quiero chicas. A Berta por las tardes terapéuticas y por ayudarme y acompañarme siempre, sobretodo un inmenso gracias por tu cariñoso apoyo con mi mami, te quiero mucho Ber. A mi Lourdes, ay mi Lou... desde que pisé por 1º vez España, has estado siempre atenta a secarme una lágrima o en sacarme una sonrisa. Me has acompañado cuando estaba en el abismo, me has llenado de mimos y me has enseñado a sonreír a pesar de tener destrozada el alma. Gracias Lou, ya sabes que te quiero muchísimo, y te echare muchísimo de menos. A mi amiga Hind, gracias porque estuviste a mi lado en la peor noche de mi vida y me acompañaste durante todo el trance que viví hasta "reinventarme", gracias por haberme hecho disfrutar tanto del tiempo juntas, sabes que te quiero un montonazo. A mis compis del piso Ainhoa, Alba, Ruth y Gloria, les agradezco un montón chicas porque me dieron ese espacio de estar sola cuando lo necesitaba como también esos abrazos o la dulce compañía cuando los requería, ya saben que las quiero un montonazo y cada una tiene una partecita del corazón de esta dulcera donde sea que vaya.

A la educación pública de mi país Argentina que hizo factible mis estudios universitarios y a toda mi gente querida que siguen ahí. A mi amiga Guadus, porque has estado conmigo brindándome fuerza para levantarme en estos inexplicables golpes de la vida y sé que siempre estarás ahí. Te quiero muchísimo Guadus. A mi mamifito, la Inge Betty que me enseñó lo que es amar lo que uno hace, esa pasión por los honguitos y que aun estando lejos igual me ha colmado de ánimo y aliento para continuar. Gracias Inge y a don Juanchi también por todo su apoyo en este tiempo, los quiero un montonazo. A mi suegris, doña Victoria gracias por darle vida y mimar a ese ser de luz que tuve la bendición de conocer y amar, Ud. se ha convertido en una madre para mí y en un ejemplo de superación, gracias por esos tiernos momentos de desahogo y por darme fuerza y calma. Saben que son la familia que heredé de él, gracias por todo el amor que me han dado, por los lindos momentos vividos y el acompañamiento en los malos, los quiero un montonazo. A mi familia, mis queridos hermanos Erick y Leo, y la más peque Malú, mis cuñadas Ivana y Ruth, y mis hermosos sobrinos por orden de llegada Maylen, Pupi, Sofi, Maxi, y Nehuén cuyas caritas iluminan mi vida, a mis tíos Marta y Carlos, Gringa y Chichí, a mi pa Gustavo y Silvana, gracias a todos por amarme, colmarme de mimos en cada regreso y por compartir conmigo los duros

momentos, gracias por estar ahí. Los quiero muchísimo y los he extrañado un montonazo.

A mi mami Noemí, no sólo nos diste vida sino que también cumpliste el papel de papá, gracias por todo tu sacrificio en brindarnos lo mejor, siempre estaré orgullosa de haber tenido una mamá como vos. Gracias por todo tu amor, tu guía y entrega mami, siempre estando ahí preocupada porque sea feliz, gracias por haberme cumplido el sueño de tener alguien mío acá en Valencia conmigo. Te amo y me haces muchísima falta. A mi cochichi Gerardo, esto llega a su fin y yo aún sigo esperando tu llegada amor, cumpliendo tu sueño yo estoy aquí en España. Gracias por tu infinito amor que me hizo tan feliz durante 10 años, la vida no es de color rosa decías pero nunca imaginamos que se nos derrumbaría tan de golpe... en mi camino cargo con nuestros recuerdos y sueños, tu sonrisa y tu mirada, como tu forma de ver la vida siempre me acompañarán. Siempre serás el amor de mi vida. Te amé, amo y amaré hasta mi final.

"Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano."

Isaac Newton (1642-1727) Matemático y físico británico.

| | |
|---|-------------|
| ÍNDICE GENERAL | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE TABLAS | XIII |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | XV |
| RESUMEN | XXI |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Podredumbres postcosecha de frutos cítricos | 1 |
| 1.1. <i>Penicillium digitatum</i> es el principal patógeno postcosecha de frutos cítricos | 3 |
| 1.2. Control de podredumbres postcosecha de frutos cítricos | 7 |
| 1.3. Estrategias alternativas de control de podredumbres postcosecha | 8 |
| 2. Péptidos antimicrobianos con actividad antifúngica | 10 |
| 3. Modo de acción de péptidos antifúngicos | 15 |
| 3.1. Modo de acción antifúngico no lítico | 16 |
| 3.2. Interacción de péptidos antimicrobianos con hongos | 17 |
| 3.3. Internalización celular de péptidos antifúngicos | 19 |
| 3.4. Muerte intracelular | 22 |
| 4. La pared celular de los hongos | 24 |
| 5. La glicosilación de proteínas | 27 |
| 5.1. Síntesis de N-glicanos | 28 |
| 5.2. Síntesis de O-glicanos | 31 |
| OBJETIVOS | 41 |
| MATERIALES Y METODOS | 45 |
| 1. Microorganismos y plásmidos | 45 |
| 2. Medios de crecimiento y condiciones de cultivo | 47 |
| 2.1. Bacterias | 47 |
| 2.2. Levaduras | 47 |
| 2.3. <i>P. digitatum</i> | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Péptidos sintéticos | 48 |
| 4. Ensayos de sensibilidad frente a compuestos antifúngicos | 49 |
| 4.1. <i>S. cerevisiae</i> | 49 |
| 4.2. <i>P. digitatum</i> | 49 |
| 5. Ensayos de actividad antimicrobiana y microbicida de péptidos sintéticos | 50 |
| 5.1. <i>S. cerevisiae</i> | 50 |
| 5.2. <i>P. digitatum</i> | 50 |
| 6. Visualización microscópica | 51 |
| 6.1. <i>S. cerevisiae</i> | 51 |
| 6.2. <i>P. digitatum</i> | 53 |
| 7. Ensayos de inoculación sobre frutos cítricos | 54 |
| 8. Extracción y purificación de ácidos nucleicos | 56 |
| 8.1. Extracción de DNA genómico de <i>P. digitatum</i> | 56 |
| 8.2. Extracción de RNA total de <i>P. digitatum</i> | 57 |
| 8.3. Extracción y purificación de otros DNA | 59 |
| 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 59 |
| 9.1. PCR estándar | 59 |
| 9.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) | 60 |
| 10. Reacciones de modificación y manipulación de ácidos nucleicos | 62 |
| 11. Electroforesis de DNA | 63 |
| 12. Construcción de la biblioteca genómica de <i>P. digitatum</i> | 63 |
| 12.1. Reparación del DNA | 64 |
| 12.2. Purificación de fragmentos de DNA genómico | 64 |
| 12.3. Reacción de ligación y empaquetamiento del fósido | 65 |
| 12.4. Infección y titulación de los fósidos sobre <i>E. coli</i> EPI300-T1 | 65 |
| 12.5. Inducción de los clones Copy Control Fosmid | 66 |
| 13. Paseo cromosómico para obtener secuencias completas de genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> | 66 |
| 14. Hibridación y detección de ácidos nucleicos | 67 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 14.1. | Marcaje de Sondas de DNA | 68 |
| 14.2. | Transferencia y fijación de DNA a membranas de nailon | 68 |
| 14.3. | Hibridación | 68 |
| 14.4. | Lavados post-hibridación y detección quimioluminiscente | 69 |
| 15. | Transformación de bacterias | 70 |
| 15.1. | Obtención de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> | 70 |
| 15.2. | Obtención de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> | 70 |
| 15.3. | Transformación de células bacterianas por electroporación | 71 |
| 16. | Transformación de levaduras | 71 |
| 16.1. | Transformación de levadura con acetato de litio | 71 |
| 16.2. | Purificación del DNA plasmídico de levaduras | 72 |
| 16.3. | Complementación funcional de genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> en levaduras | 72 |
| 16.4. | Ensayo de sensibilidad a blanco de calcofluor | 74 |
| 17. | Transformación de <i>P. digitatum</i> | 75 |
| 17.1. | Construcciones para la disrupción de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> | 75 |
| 17.2. | Construcciones para la expresión constitutiva de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> | 78 |
| 17.3. | Transformación genética de <i>P. digitatum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> | 80 |
| 18. | Programas y bases de datos utilizados | 84 |
| | RESULTADOS | 89 |
| 1. | Caracterización del mecanismo de acción de péptidos antifúngicos sobre <i>S. cerevisiae</i>. Implicación de genes de la glicosilación de proteínas | 89 |
| 1.1. | Genes que determinan la susceptibilidad frente a PAF26 y a compuestos desestabilizantes de pared celular en <i>S. cerevisiae</i> | 89 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 1.2. | Estudio comparado de la actividad inhibitoria y fungicida de PAF26 y otros péptidos antimicrobianos sobre mutantes de N- y O-glicosilación relevantes | 92 |
| 1.3. | Interacción y localización del péptido PAF26 y sus derivados sobre <i>S. cerevisiae</i> | 95 |
| 1.4. | Estudio comparado de la interacción y localización de PAF26 sobre distintos mutantes en <i>S. cerevisiae</i> | 98 |
| 1.5. | Implicación de la pared celular en la interacción con el péptido PAF26 y la susceptibilidad al mismo en la cepa parental <i>S. cerevisiae</i> y su mutante $\Delta eos1$ | 106 |
| 2. | Identificación y caracterización de la expresión génica de la familia de genes <i>PMT</i> en <i>Penicillium digitatum</i> | 111 |
| 2.1. | Identificación de tres fragmentos parciales de los posibles genes <i>PMT</i> en <i>P. digitatum</i> | 112 |
| 2.2. | Construcción y caracterización de la biblioteca genómica de <i>P. digitatum</i> | 114 |
| 2.3. | Aislamiento de los genes <i>PMT</i> en la biblioteca genómica de <i>P. digitatum</i> | 120 |
| 2.4. | Análisis de las secuencias de las proteínas Pmt de <i>P. digitatum</i> | 125 |
| 2.5. | Caracterización funcional de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> en <i>S. cerevisiae</i> | 131 |
| 2.6. | Estudio de los cambios de expresión de los genes <i>PMT</i> durante el crecimiento axénico de <i>P. digitatum</i> | 134 |
| 3. | Caracterización funcional del gen <i>PMT2</i> de <i>Penicillium digitatum</i> | 144 |
| 3.1. | Obtención de los transformantes de los genes <i>PMT</i> en <i>P. digitatum</i> | 144 |
| 3.2. | Caracterización molecular de los transformantes <i>PdigPMT2</i> obtenidos | 150 |
| 3.3. | La disrupción del gen <i>PMT2</i> afecta el crecimiento y la esporulación de <i>Penicillium digitatum</i> | 155 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| 3.4. | Estudio de la morfología del disrupto PDEH515 por microscopía de fluorescencia | 159 |
| 3.5. | Estudio de la influencia del gen <i>PdigPMT2</i> en la sensibilidad a compuestos antifúngicos | 165 |
| 3.6. | Efecto de la disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> sobre la sensibilidad a PAF26 | 168 |
| 3.7. | El gen <i>PdigPMT2</i> está implicado en la virulencia de <i>P. digitatum</i> | 172 |
| DISCUSIÓN | | 181 |
| 1. | Mecanismo de acción de PAF26. Importancia de la pared celular y la glicosilación de proteínas en la interacción y actividad del péptido | 183 |
| 1.1. | El mecanismo de acción de PAF26 presenta al menos tres etapas secuenciales | 183 |
| 1.2. | Importancia de la pared celular en el mecanismo de acción de PAF26 | 187 |
| 1.3. | La glicosilación de proteínas determina la actividad antifúngica de PAF26. | 189 |
| 1.4. | Implicación del gen <i>ARG1</i> en la actividad intracelular de PAF26 | 196 |
| 2. | El gen <i>PdigPmt2</i> del hongo <i>P. digitatum</i> está implicado en la integridad de pared celular, conidiogénesis, virulencia y sensibilidad al péptido antifúngico PAF26 | 199 |
| 2.1. | La familia de genes <i>PMT</i> en el hongo <i>P. digitatum</i> está compuesta por tres miembros que se expresan en cultivo <i>in vitro</i> | 199 |
| 2.2. | La disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> de <i>P. digitatum</i> tiene un fenotipo viable | 201 |
| 2.3. | El gen <i>PdigPMT2</i> es necesario para el crecimiento, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la conidiogénesis | 203 |

| | | |
|------|--|------------|
| 2.4. | Implicación del gen <i>PdigPMT2</i> en la actividad de PAF26 sobre <i>P. digitatum</i> | 206 |
| 2.5. | Participación de los genes <i>PMT</i> en la infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos cítricos | 209 |
| | CONCLUSIONES | 217 |
| | DIFUSIÓN DE RESULTADOS | 221 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 217 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Reproducción asexual de <i>P. digitatum</i> . | 4 |
| Figura 2. Ciclo biológico de <i>P. digitatum</i> . | 5 |
| Figura 3. Estructura tridimensional y secuencia de aminoácidos del péptido PAF26. | 15 |
| Figura 4. Visualización de la interacción del péptido FITC-PAF26 con <i>P. digitatum</i> . | 21 |
| Figura 5. Estructura y composición de la pared celular de hongos filamentosos. | 25 |
| Figura 6. Ruta biosintética de los N-glicanos de <i>S. cerevisiae</i> en el ER. | 29 |
| Figura 7. Procesamiento de los N-glicanos de <i>S. cerevisiae</i> en el aparato de Golgi. | 30 |
| Figura 8. Estructuras típicas de los O-glicanos sintetizados en distintos hongos. | 32 |
| Figura 9. Formación de complejos heterodiméricos entre las subfamilias PMT1 y PMT2 y de homómeros en la subfamilia PMT4. | 34 |
| Figura 10. Modelo de la topología de la proteína ScerPmt1p. | 35 |
| Figura 11. Evolución de la podredumbre verde causada por <i>P. digitatum</i> CECT20796 sobre frutos cítricos. | 55 |
| Figura 12. Mapa del plásmido pGREG505. | 73 |
| Figura 13. Esquema de la estrategia de PCR de Fusión para la disrupción génica con el casete de higromicina. | 76 |
| Figura 14. Mapa del vector binario pGKO2. | 78 |
| Figura 15. Mapa del vector binario pBht2. | 79 |
| Figura 16. Esquema del protocolo para la transformación genética de <i>P. digitatum</i> mediado por <i>A. tumefaciens</i> . | 83 |
| Figura 17. Análisis de la sensibilidad de las cepas deletantes en los genes <i>ECM33</i> , <i>ARG1</i> e <i>IPT1</i> y la cepa parental BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> frente a distintos compuestos antifúngicos. | 90 |
| Figura 18. Análisis de la sensibilidad de las cepas deletantes en genes de glicosilación de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> frente al péptido PAF26 y compuestos relacionados con defectos en la síntesis de pared celular. | 91 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Curvas dosis-respuesta de la actividad microbicida de los péptidos PAF26 (A), P113 (B) y melitina (C) frente a las cepas deletantes $\Delta eos1$, $\Delta pmt2$ y la cepa parental BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> . | 94 |
| Figura 20. Localización del péptido TMR-PAF26 en <i>S. cerevisiae</i> BY4741 mediante microscopía confocal láser. | 96 |
| Figura 21. Actividad y localización de péptidos derivados de PAF26 frente a <i>S. cerevisiae</i> BY4741. | 99 |
| Figura 22. Localización diferencial del péptido TMR-PAF26 en cepas deletantes de <i>S. cerevisiae</i> mediante microscopía confocal láser. | 100 |
| Figura 23. Análisis de la localización diferencial de TMR-PAF26 en cepas deletantes seleccionadas de <i>S. cerevisiae</i> . | 101 |
| Figura 24. Visualización de la localización en vacuolas del péptido TMR-PAF26 y la sonda cFDDFA en <i>S. cerevisiae</i> BY4741 mediante microscopía confocal láser. | 102 |
| Figura 25. Localización del péptido TMR-PAF26 en cepas deletantes en genes <i>PMT</i> de <i>S. cerevisiae</i> con microscopía confocal láser. | 105 |
| Figura 26. Localización del péptido TMR-PAF26 en células enteras y protoplastos de <i>S. cerevisiae</i> con microscopía confocal láser. | 107 |
| Figura 27. Análisis comparativo de la localización diferencial de TMR-PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de <i>S. cerevisiae</i> . | 108 |
| Figura 28. Visualización de la muerte celular causada por el péptido PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de <i>S. cerevisiae</i> con microscopía confocal láser. | 110 |
| Figura 29. Análisis comparativo de la acción fungicida de PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de <i>S. cerevisiae</i> . | 111 |
| Figura 30. Amplificación por PCR de fragmentos parciales de genes <i>PMT</i> en <i>P. digitatum</i> . | 113 |
| Figura 31. Electroforesis normal (A) y bajo campo pulsante (B) del DNA genómico de <i>P. digitatum</i> . | 115 |
| Figura 32. Colonias de bacterias <i>E. coli</i> (EPI300-T1) conteniendo los fósmidos empaquetados. | 116 |
| Figura 33. Electroforesis del DNA purificado de seis fósmidos inducidos (A) y digeridos con <i>Bam</i> HI (B). | 118 |
| Figura 34. Representación esquemática de la búsqueda por PCR de fósmidos positivos. | 119 |

| | |
|---|-----|
| Figura 35. Identificación del fósido individual que contiene <i>PdigPMT2</i> . _____ | 120 |
| Figura 36. Paseo cromosómico sobre los fósidos individuales identificados para aislar las secuencias completas de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 122 |
| Figura 37. Organización genómica de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> comparados con <i>P. chrysogenum</i> . _____ | 124 |
| Figura 38. Sitios de unión a factores de transcripción en las regiones promotoras de los genes <i>PdigPMT</i> en <i>P. digitatum</i> . _____ | 125 |
| Figura 39. Alineamiento del dominio <i>PMT</i> de las proteínas de <i>P. digitatum</i> y hongos relacionados. _____ | 126 |
| Figura 40. Alineamiento del dominio <i>MIR</i> de las proteínas <i>Pmt</i> deducidas de <i>P. digitatum</i> con las de otros hongos. _____ | 128 |
| Figura 41. Árbol filogenético de las proteínas deducidas <i>Pmt1p</i> , <i>Pmt2p</i> y <i>Pmt4p</i> de <i>P. digitatum</i> y sus respectivos homólogos en otros hongos. _____ | 129 |
| Figura 42. Organización de los dominios de la familia de proteínas <i>Pmt</i> deducidas en <i>P. digitatum</i> . _____ | 130 |
| Figura 43. Análisis funcional de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> en levaduras. _____ | 132 |
| Figura 44. Complementación de la delección del gen <i>PMT2</i> en <i>S. cerevisiae</i> con los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 134 |
| Figura 45. Curvas de calibración obtenidas por qRT-PCR para el gen <i>PdigPMT1</i> de <i>P. digitatum</i> (A) y para el gen de referencia <i>L18</i> (B). _____ | 135 |
| Figura 46. Cuantificación absoluta de la expresión de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 136 |
| Figura 47. Expresión relativa de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> durante el crecimiento en medio líquido PDB mediante qRT-PCR. _____ | 137 |
| Figura 48. A) Expresión relativa de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> durante el crecimiento en medio sólido PDA mediante qRT-PCR. _____ | 138 |
| Figura 49. Expresión relativa de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> durante el crecimiento en medio PDA bajo condiciones de estrés oxidativo y osmótico mediante qRT-PCR. _____ | 139 |
| Figura 50. Expresión relativa de los genes <i>PMT</i> en cultivos sumergidos de <i>P. digitatum</i> expuestos al péptido <i>PAF26</i> mediante qRT-PCR. _____ | 141 |
| Figura 51. Expresión relativa de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> durante el progreso de la infección sobre frutos de naranjas mediante qRT-PCR. _____ | 143 |

| | |
|---|-----|
| Figura 52. Construcción del casete para la disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> de <i>P. digitatum</i> . | 146 |
| Figura 53. Construcción para la expresión constitutiva del gen <i>PdigPMT2</i> bajo el promotor <i>gpdA</i> . | 147 |
| Figura 54. Disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> de <i>P. digitatum</i> . | 153 |
| Figura 55. Análisis Southern del disrupto PDEH515. | 154 |
| Figura 56. Expresión constitutiva del gen <i>PdigPMT2</i> en <i>P. digitatum</i> . | 155 |
| Figura 57. Fenotipo de crecimiento del disrupto PDEH515 en medio sólido PDA. | 157 |
| Figura 58. Efecto de sorbitol sobre el crecimiento del disrupto PDEH515 en medio sólido PDA. | 158 |
| Figura 59. Efecto de sorbitol sobre la esporulación del disrupto PDEH515. | 159 |
| Figura 60. Germinación de los conidios de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515. | 160 |
| Figura 61. Crecimiento del micelio de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515. | 163 |
| Figura 62. Reproducción asexual de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515. | 164 |
| Figura 63. Sensibilidad de PHI26, PDEH515 y PDEH540 a distintos compuestos antifúngicos. | 166 |
| Figura 64. Sensibilidad de transformantes constitutivos (PDEH8, PDEH9, PDEH59, PDEH67, PDEH144, PDEH152) frente distintos compuestos antifúngicos. | 167 |
| Figura 65. Sensibilidad de distintas cepas transformantes de <i>P. digitatum</i> al peróxido de hidrógeno. | 168 |
| Figura 66. Curvas dosis-respuesta del péptido PAF26 frente a distintas cepas transformantes. | 169 |
| Figura 67. Efecto del péptido PAF26 sobre la viabilidad de los conidios de distintas cepas transformantes. | 171 |
| Figura 68. Evolución de la infección producida por PHI26 y PDEH515 sobre frutos de naranja. | 174 |
| Figura 69. Evolución de la infección producida por distintas cepas transformantes de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja. | 176 |
| Figura 70. Expresión relativa de los genes <i>PdigPMT1</i> y <i>PdigPMT4</i> de PHI26 y PDEH515 durante la infección sobre frutos de naranjas. | 177 |

| | |
|---|-----|
| Figura 71. Localización de los péptidos PAF26, PAF95 y PAF96 marcados fluorescentemente en <i>S. cerevisiae</i> y <i>N. crassa</i> con microscopía confocal láser. | 187 |
| Figura 72. Genes de N- y O-glicosilación de proteínas en <i>S. cerevisiae</i> que actúan como determinantes de la sensibilidad frente al péptido PAF26. | 191 |
| Figura 73. Modelos teóricos de la implicación de proteínas glicosiladas como determinantes en la actividad de péptidos antimicrobianos. | 195 |
| Figura 74. Representación esquemática del mecanismo antifúngico de PAF26 a concentraciones sub-inhibitorias en <i>S. cerevisiae</i> y <i>N. crassa</i> . | 198 |
| Figura 75. Efecto de la disrupción de <i>PdigPMT2</i> sobre distintos procesos biológicos de <i>P. digitatum</i> . | 213 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1: Hongos patógenos de postcosecha. _____ | 2 |
| Tabla 2. Clasificación taxonómica. _____ | 3 |
| Tabla 3. Funciones relacionadas con las manosiltransferasas de proteínas en hongos. _____ | 37 |
| Tabla 4. Listado de microorganismos utilizados en este trabajo. _____ | 45 |
| Tabla 5. Plásmidos obtenidos en esta tesis. _____ | 46 |
| Tabla 6. Secuencias y propiedades de los péptidos usados en este estudio. _____ | 48 |
| Tabla 7. Oligonucleótidos específicos diseñados para qRT-PCR. _____ | 62 |
| Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para el paseo cromosómico de los fósquidos individuales de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 67 |
| Tabla 9. Soluciones usadas para la hibridación por Southern. _____ | 69 |
| Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la complementación funcional con pGREG505. _____ | 74 |
| Tabla 11. Oligonucleótidos usados para las construcciones de interrupción y expresión constitutiva de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 77 |
| Tabla 12. Soluciones y medios usados para la transformación genética de <i>P. digitatum</i> . _____ | 82 |
| Tabla 13. Programas bioinformáticos y bases de datos empleadas en este trabajo. _____ | 85 |
| Tabla 14. Valores inhibitorios de los distintos péptidos ensayados frente a las cepas seleccionadas de la levadura <i>S. cerevisiae</i> . _____ | 93 |
| Tabla 15. Pareja de oligonucleótidos degenerados diseñados y usados para aislar los fragmentos parciales de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 112 |
| Tabla 16. Análisis de homología de los tres amplicones obtenidos con los oligonucleótidos degenerados de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 114 |
| Tabla 17. Identificación de los fósquidos individuales para los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> por PCR con oligonucleótidos específicos. _____ | 121 |
| Tabla 18. Análisis de homología de las secuencias obtenidas de los fósquidos portadores de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> . _____ | 123 |

Tabla 19. Relación entre secuencias homólogas y no homólogas para la construcción del casete de interrupción por PCR Fusión con los tres genes *PMT* de *P. digitatum*. _____ 145

Tabla 20. Resumen de los ensayos realizados para la obtención de los disruptos en los tres genes *PMT* de *P. digitatum*. _____ 148

Tabla 21. Resumen de los transformantes obtenidos para la expresión constitutiva de los tres genes *PMT* de *P. digitatum*. _____ 149

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AFP: Proteína antifúngica
- Afum: *A. fumigatus*
- Ala (A): Alanina
- Anid: *A. nidulans*
- AFP: Proteína antifúngica
- AMP: Péptido antimicrobiano
- Amp: Ampicilina
- Arg (R): Arginina
- AS: Acetosiringona
- Asn (N): Asparagina
- Asp (D): Ácido aspártico
- ATMT: Transformación mediada por *A. tumefaciens*
- Bcin: *B. cinerea*
- BCA: Agente de biocontrol
- CFW: Blanco de Calcofluor
- cDFFDA: sonda vacuolar Oregon Green 488 carboxylic acid
- Cef: Cefotaxima
- CHS: Quitin-sintasas
- Cys (C): Cisteína
- CM: Medio de co-cultivo
- CPP: Péptido tipo penetratina
- CP-AMP: Péptido antimicrobiano tipo penetratina
- CR: Rojo congo

DIG: Digoxigenina
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTT: Ditioneitol
DO: Densidad óptica
dpi: Días post-inoculación
 ϵ : Coeficiente de extension molar
ER: Retículo endoplasmático
F2dU: Fluoro-deoxi-uridina
FITC: 5-isotiocianato de fluoresceína
GAL: Galactosa
gDNA: DNA genómico
GOI: Gen de interés
GLU: Glucosa
Glu (E): Ácido glutámico
Gln (Q): Glutamina
Gly (G): Glicina
His (H): Histidina
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
Hyg: Higromicina
IM: Medio de inducción
IMZ: Imazalil
Ile (I): Isoleucina
Kan: Kanamicina
LB: Luria- Bertani

Leu (L): Leucina

Lys (K): Lisina

Met (M): Metionina

Mgri: *M. grisea*

MIC: Mínima concentración inhibitoria

MIR: Dominio manosiltransferasa-receptores de rianodina inositol trifosfato

MM: Medio mínimo

MOPS: 3-(N-morfolino)-propanosulfónico

Mox: Moxalactam

Ncra: *N. crassa*

ORF: Pauta de lectura abierta

PAF: Péptido antifúngico

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pchry: *P. chrysogenum*

PDA: Patata dextrosa agar

PDB: Caldo patata dextrosa

Pdig: *P. digitatum*

PEG: Polietilenglicol

Phe (F): Fenilalanina

PI: Yoduro de propidio

PMT: Manosiltransferasas de proteínas

Pro (P): Prolina

Rif: Rifampicina

- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real
- SC-Leu: Medio sintético carente de leucina
- Scer: *S. cerevisiae*
- Ser (S): Serina
- SD: Desviación estándar
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- TBZ: Tiabendazol
- T-DNA: DNA de transferencia
- Thr (T): Treonina
- Tm: Temperatura de hibridación (Thib)
- TM: Regiones transmembranas
- TMR: Tetrametilrodamina
- Trp (W): Triptófano
- Tyr (Y): Tirosina
- UFC: Unidades formadoras de colonias
- Val (V): Valina
- YPD: Medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa



RESUMEN

RESUMEN

Penicillium digitatum (Pers.) Sacc. es un hongo necrótrofo y el principal causante de podredumbres postcosecha de frutos cítricos, siendo responsable de importantes pérdidas en la producción. Nuestro grupo ha trabajado en la caracterización de péptidos antimicrobianos (AMP) como potenciales antifúngicos para ser aplicados en el ámbito de protección vegetal y la conservación postcosecha. El conocimiento del mecanismo de acción antimicrobiana de estos AMP es crucial para mejorar sus propiedades antifúngicas y especificidad, así como para posibilitar su aplicación futura. PAF26 es un hexapéptido sintético del tipo penetratina que inhibe el crecimiento e infección de *P. digitatum* a concentraciones micromolares, y que ha sido propuesto como modelo para la caracterización de esta clase de péptidos. En esta tesis se ha profundizado en la caracterización del mecanismo de acción de PAF26 sobre *S. cerevisiae* como microorganismo modelo. Mediante microscopía confocal, se ha demostrado que PAF26 marcado fluorescentemente interactúa primero con las envueltas celulares, se internaliza en vacuolas y luego se libera al citoplasma coincidiendo con la muerte celular, de forma similar a lo observado en *N. crassa*. Se ha constatado que los dominios catiónicos e hidrofóbicos de PAF26 se requieren para su actividad, siendo el dominio catiónico necesario para su interacción y el dominio hidrofóbico para su internalización. El péptido se localizó principalmente en las vacuolas de la cepa resistente $\Delta arg1$, mutada en un gen del metabolismo de la arginina. Se ha demostrado que la actividad fungicida de PAF26 depende de una pared celular funcional ya que los protoplastos de levadura fueron menos sensibles al péptido. Por otro lado, se ha confirmado que cepas mutantes con deleciones en los genes de N- y O-glicosilación de proteínas *EOS1* y *PMT2* son resistentes a PAF26 y a otro AMP del tipo penetratina derivado de la histatina 5. Además, la mutación del gen *EOS1* bloqueó la internalización del péptido PAF26 y esta localización diferencial no cambió en protoplastos. Estos datos sugieren que Eos1p participaría en la glicosilación de proteínas de la pared celular necesarias para la internalización y por consiguiente actividad antifúngica de PAF26.

Las manosiltransferasas de proteínas (*PMT*) catalizan la primera reacción de O-glicosilación de proteínas y se han implicado en morfogénesis y virulencia de patógenos fúngicos, así como en la sensibilidad de *S. cerevisiae* a péptidos antifúngicos como acabamos de describir. Por ello, en esta tesis se ha abordado la identificación de los genes de la familia *PMT* en *P. digitatum*, encontrándose un miembro para cada una de las tres subfamilias *PMT*. Las proteínas deducidas PdigPmt1p, PdigPmt2p y PdigPmt4p presentan los dominios conservados característicos de las *PMT*. Se demostró que *PdigPMT2* es un ortólogo funcional de *PMT2* de *S. cerevisiae* mediante ensayos de complementación funcional. Se analizaron los cambios de expresión de los genes *PMT* por PCR cuantitativa y se comprobó que se inducen durante el crecimiento *in vitro* del hongo e incluso bajo condiciones de estrés osmótico y oxidativo, y durante la infección sobre frutos cítricos. Por el contrario, los tres genes fueron fuertemente reprimidos en el hongo expuesto a PAF26.

Para conocer en más detalle la función de la familia génica *PMT* de *P. digitatum* se puso a punto la transformación genética de este hongo usando la bacteria fitopatogena *A. tumefaciens*. Se obtuvieron varias cepas transformantes para la expresión constitutiva de los tres genes *PMT* y sólo un mutante con la delección del gen *PdigPMT2* (PDEH515). La caracterización fenotípica de PDEH515 reveló la importancia de *PdigPMT2* en el crecimiento, conidiogénesis, sensibilidad a compuestos antifúngicos y virulencia de *P. digitatum*. PDEH515 se caracterizó por un crecimiento reducido que fue osmorremediable y una fuerte reducción en la producción de conidios. Además, se observó por microscopía de fluorescencia la formación anómala de conidióforos y defectos morfológicos en su micelio. El mutante PDEH515 fue más sensible a blanco de calcoflúor y rojo Congo, mientras que exhibió un leve incremento de tolerancia a especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, los conidios fueron resistentes a PAF26 confirmando que la glicosilación de proteínas determina la sensibilidad a péptidos antifúngicos en hongos. Se comprobó que *PdigPMT2* es necesario para la completa virulencia de *P. digitatum* sobre frutos cítricos.

A microscopic image showing several long, thin, filamentous structures, likely algae, against a light blue background. The filaments are composed of individual cells, some of which are slightly thicker or more rounded than others. The word "INTRODUCCIÓN" is overlaid in bold black text on the right side of the image.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Podredumbres postcosecha de frutos cítricos

España es uno de los países con mayor producción de frutos cítricos ocupando la quinta posición mundial en el año 2010 (5,6 millones de toneladas) y es el país líder de exportación de cítricos para consumo en fresco (www.faostat3.fao.org). Las patologías fúngicas son una de las principales causas de las pérdidas ocasionadas durante la manipulación y conservación postcosecha de los frutos. Los porcentajes que se pierden en la producción varían según las condiciones ambientales dependiendo de la campaña, la época del año, la madurez del fruto, y los procesos de recolección, almacenamiento, confección y comercialización. Se estima que entre el 3 y el 5 % de las pérdidas postcosecha son debidas a podredumbres, pudiendo alcanzar el 8-12 % en años de climatología favorable para el desarrollo de las infecciones fúngicas (Tuset, 1987). Si consideramos solo la producción anual de cítricos de la Comunidad Valenciana, estas pérdidas representarían un mínimo de 150000 toneladas.

En España se han identificado alrededor de una veintena de especies de hongos responsables de podredumbres en los frutos cítricos (**Tabla 1**). La incidencia de una especie u otra varía dependiendo de la campaña, comercialización y, dentro de la misma, según la localización geográfica de las áreas cítricas. Los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, causantes de la podredumbre verde y azul, respectivamente, contribuyen al 60-80 % del total de los podridos producidos (Tuset, 1987). Ambos hongos están estrechamente relacionados filogenética y biológicamente (Tuset, 1987; López-García *et al.*, 2002). A diferencia de *P. digitatum*, *P. italicum* se desarrolla principalmente durante la frigoconservación a temperaturas próximas a 5 °C y si bien es un patógeno importante de frutos cítricos también puede atacar otros frutos y vegetales.

Tabla 1: Hongos patógenos de postcosecha.

| Agente causal | Nombre de la Enfermedad |
|---|--------------------------------|
| <i>Penicillium digitatum</i> Pers. Sacc. | Podredumbre verde |
| <i>Penicillium italicum</i> Stoll | Podredumbre azul |
| <i>Botrytis cinerea</i> Pers. | Podredumbre gris |
| <i>Geotrichum candidum</i> Link | Podredumbre amarga |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. | Podredumbre por Rhizopus |
| <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. | |
| <i>Alternaria citri</i> Ellis & N. Pierce | Podredumbre negra |
| <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. | |
| <i>Phytophthora citrophthora</i> (R. E. Sm. & E. H. Sm.) Leonian | Podredumbre marrón |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. [teleomorfo <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk] | Antracnosis |
| <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link | Podredumbre verde-gris |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary | Podredumbre blanca |
| <i>Diplodia natalensis</i> Pole-Evans | Podrido del tallo |

Entre las especies fúngicas de menor incidencia durante la postcosecha y conservación de los frutos cítricos (**Tabla 1**) se encuentran otros patógenos de heridas como *Botrytis cinerea* y *Geotrichum candidum* que causan la podredumbre gris y la podredumbre amarga, respectivamente (Tuset, 1987), *Alternaria citri* que produce la podredumbre negra infecta el tejido interno del fruto cuando está dañado o fisiológicamente débil. Estos hongos junto con *Rhizopus stolonifer*, están habitualmente presentes en las centrales hortofrutícolas y en sus cámaras de frigoconservación, representando una importante fuente de contaminación en estos casos (Tuset, 1987). *Phytophthora citrophthora* infecta los frutos cítricos sólo cuando los frutos permanecen húmedos durante largos periodos de tiempo produciendo la podredumbre marrón. *Colletotrichum gloeosporioides* es el único patógeno postcosecha que penetra en el tejido del fruto mediante la formación de apresorios y da lugar a la antracnosis.

1.1. *Penicillium digitatum* es el principal patógeno postcosecha de frutos cítricos

El hongo *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. es el principal agente causal de las podredumbres postcosecha en los frutos cítricos del mediterráneo. Su clasificación taxonómica se encuentra detallada en la **Tabla 2** (www.eol.org); pertenece al subphylum Pezizomycotina y se caracteriza por ser un hongo imperfecto cuya fase sexual no se conoce.

Tabla 2. Clasificación taxonómica.

| | |
|------------------|--|
| Reino | Fungi |
| Phylum | Ascomycota |
| Subphylum | Pezizomycotina |
| Clase | Eurotiomycetes |
| Orden | Eurotiales |
| Familia | Trichocomaceae |
| Género | <i>Penicillium</i> |
| Especie | <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc. |

Su estructura de reproducción asexual son los conidióforos formados por hifas fértiles que portan los conidios (**Figura 1**). Los conidióforos son biverticilados ó asimétricos según las ramas que presenten, y están formados por un número indefinido de métulas que portan las fiálides (en número limitado de 3 a 5). Las fiálides o células conidiógenas terminan en largas cadenas basipétalas de conidios (130-160 μm). Estos son lisos, de forma elíptica con una longitud de 3,5-12 μm y ancho de 3-8 μm presentando una coloración verde oliva en masa.

Un aspecto relevante es que *P. digitatum* afecta específicamente a los frutos cítricos, ya que no ha sido descrito de forma natural en otros órganos vegetales. Es un hongo necrótrofo que penetra en el tejido vegetal a través de las heridas producidas por agentes externos bióticos o abióticos en la parte coloreada de la piel del cítrico (flavedo) (Tuset, 1987, 1999).

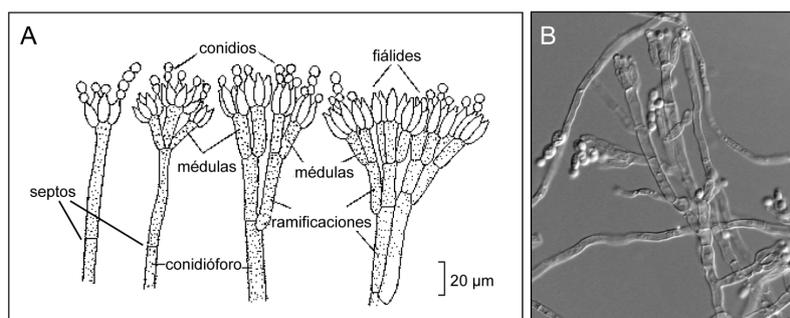


Figura 1. Reproducción asexual de *P. digitatum*.

A) Esquema de la estructura de los conidióforos y sus partes con distintos niveles de ramificación y B) Visualización de los conidióforos en microscopía óptica con contraste interferencial diferencial DIC (Muñoz, 2008).

Los conidios son la principal fuente de inóculo para el desarrollo de esta enfermedad ya que pueden permanecer latentes sobre la superficie de los frutos hasta que se den las condiciones propicias para su germinación y colonización de los frutos (albedo). Entre los factores que favorecen la infección se encuentran la presencia de roturas en el flavedo, el estado avanzado de maduración del fruto, y las condiciones ambientales adecuadas como temperatura (24 °C) y humedad del aire (80 %). La contaminación por este hongo procede mayoritariamente del campo, aunque también ocurre durante la recolección, transporte, confección y comercialización de cítricos (Tuset, 1987).

El ciclo biológico infeccioso de *P. digitatum* se representa en la **Figura 2**. La principal sintomatología de la enfermedad que produce es la maceración de los tejidos del fruto que da lugar a una pérdida de su consistencia y desencadena en una pudrición blanda característica. El signo visible del desarrollo del hongo es la presencia del micelio blanquecino sobre la superficie de la lesión que luego cambia al color verde oliváceo debido a la esporulación del patógeno. Los cultivos axénicos de este hongo en placas de agar patata dextrosa (PDA) son colonias típicas de color verde.

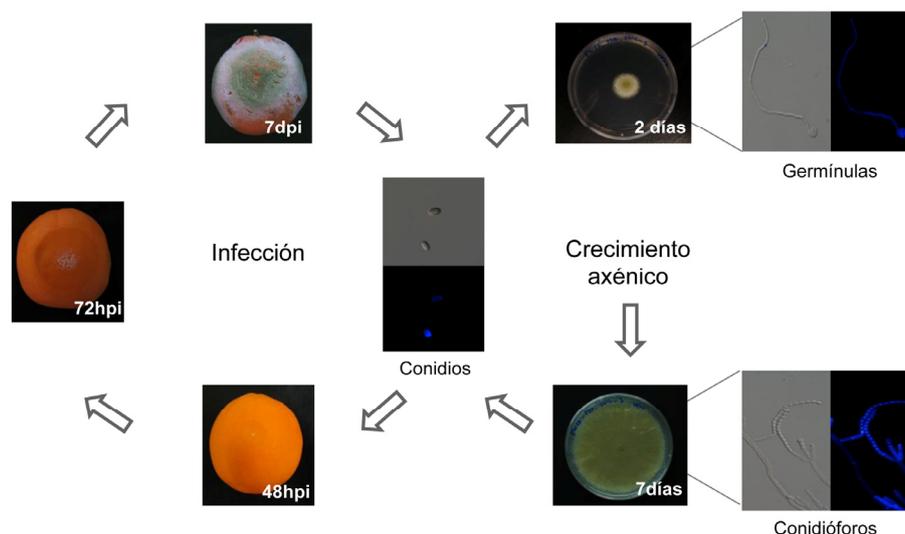


Figura 2. Ciclo biológico de *P. digitatum*.

A pesar de la importancia que tiene *P. digitatum* por las pérdidas económicas que produce en frutos cítricos, las bases moleculares de su mecanismo de infección aún son poco conocidas. En los últimos años, se han desarrollado diversas herramientas genómicas y moleculares para tratar de profundizar en dicho aspecto. En estudios transcriptómicos de frutos cítricos infectados por *P. digitatum* se ha comprobado la participación del metabolismo secundario y de aminoácidos en la respuesta a la infección fúngica (González-Candelas *et al.*, 2010; Ballester *et al.*, 2011). Se destaca la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de isoprenoides, alcaloides y fenilpropanoides. Además, se ha confirmado el papel del etileno como regulador de parte de las respuestas de defensa durante la interacción del hongo con los frutos cítricos (Marcos *et al.*, 2005); (González-Candelas *et al.*, 2010).

Los factores necesarios para la patogenicidad o virulencia de *P. digitatum* sobre frutos cítricos son aún poco conocidos. Existen estudios que reflejan la importancia de la pared celular en el proceso infectivo de varios patógenos fúngicos, tal y como se lo ha demostrado con genes implicados en la síntesis de quitina (Weber *et al.*, 2006; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2011). La

quitina es uno de los polisacáridos que forman parte de la pared celular de los hongos (ver más adelante). Por ello, nuestro grupo ha trabajado en la identificación de la familia génica de quitin-sintasas (*CHS*) en *P. digitatum* y la caracterización de su expresión durante el crecimiento e infección del hongo sobre frutos cítricos (Gandía *et al.*, 2012). Se ha detectado que los genes *PdigCHS* de la clase I, III, V y VII se inducen con el progreso de infección. Actualmente, se está llevando a cabo la disrupción génica de dichos genes para evaluar su participación en patogénesis.

La transformación genética es esencial para la caracterización funcional de los genes de un hongo. En el año 2008, se describió por primera vez la transformación genética de *P. digitatum* mediada por *A. tumefaciens* (Wang y Li, 2008). Varias investigaciones han usado dicho sistema para caracterizar la resistencia generada en aislados de *P. digitatum* frente a fungicidas químicos, que constituye uno de los principales inconvenientes del uso desmedido de los mismos. Así, se ha comprobado que dos genes *CYP51B* involucrados en la síntesis de ergosterol y el gen *MFS1* que forma parte de la superfamilia de transportadores de membrana MFS participan en cierta manera en el mecanismo de resistencia a imazalil (Sun *et al.*, 2011b; Wang, 2012). Por otro lado, un estudio reciente ha descrito por primera vez la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en *P. digitatum* para estudiar las interacciones hongo-huésped durante su infección sobre naranjas y de forma análoga con *P. expansum* sobre manzanas (Buron-Moles *et al.*, 2012).

La disponibilidad del genoma de *P. digitatum* abre nuevas perspectivas para el abordaje molecular del mecanismo de virulencia y especificidad con el huésped de este hongo necrótrofo. Recientemente se ha realizado la secuenciación completa del genoma de dos cepas españolas virulentas de *P. digitatum* que difieren en su resistencia a fungicidas, la cepa resistente Pd1 y la cepa sensible PHI26 (Marcet-Houben *et al.*, 2012). Cabe resaltar que esta última es el objeto de estudio en esta tesis. Este estudio ha permitido confirmar su cercanía filogenética con otras especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Además se ha constatado la elevada similitud entre ambas cepas y la estabilidad genética de este hongo. Por

ejemplo, el genoma mitocondrial de ambas cepas resultó idéntico al del aislado pd01 de *P. digitatum* procedente de China (Sun *et al.*, 2011a) indicando la expansión geográfica reciente de este hongo a escala mundial.

1.2. Control de podredumbres postcosecha de frutos cítricos

Una de las medidas de prevención general para evitar el desarrollo de las infecciones fúngicas postcosecha es el cuidado de los frutos en el campo, manteniendo una buena calidad de su piel en el periodo de madurez y de su sanidad para reducir el nivel de inóculo (conidios y estructuras fúngicas capaces de infectar). Es necesario que los frutos lleguen al almacén sin presentar daños ni alteraciones fisiológicas en la corteza, las cuales se van haciendo más patentes con el transcurso del almacenamiento de los frutos y suponen un ambiente apropiado para el desarrollo de las infecciones fúngicas. Además es muy importante minimizar las dosis de inóculo en toda la maquinaria utilizada en los procesos de recolección, almacenamiento y confección.

La aplicación de fungicidas químicos es la medida terapéutica de uso generalizado para el control directo de las patologías postcosecha de frutos cítricos. Si bien existe una amplia variedad de fungicidas disponibles en el mercado, el compuesto ortofenilfenato sódico (SOPP), el tiabendazol (TBZ) y el imazalil (IMZ) son los más utilizados en la Comunidad Valenciana (Tuset, 1999; Tuset *et al.*, 2000). El compuesto SOPP es uno de los fungicidas químicos de amplio espectro usados. El TBZ es un fungicida derivado del benzimidazol y dentro de este grupo también se encuentran benomilo y carbenzadima. Estos compuestos han sido eficaces frente a un amplio espectro de hongos como *Penicillium*, *Diplodia natalensis* y *Colletotrichum*. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la tubulina del citoesqueleto interfiriendo en los procesos mitóticos (Davidse, 1988). Otros de los fungicidas usados corresponden al grupo de los derivados del imidazol, como el IMZ y el procloraz. Estos compuestos inhiben la biosíntesis de ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de los hongos. Su espectro antifúngico es similar al de los benzimidazoles y son muy eficaces en el control de *P. digitatum* y *P. italicum*, incluso para aislados que son resistentes a otros fungicidas como TBZ o benomilo (Eckert y Ogawa, 1985). Los

tratamientos con fungicidas se realizan mediante el baño, la ducha o la inclusión en ceras utilizadas para la confección.

A pesar de su efectividad, existen una serie de problemas asociados a la utilización de fungicidas. El más evidente es su toxicidad inespecífica, con sus efectos nocivos para la salud humana y la contaminación del medio ambiente. Este problema hace que sea importante controlar las dosis de fungicida utilizadas y establecer límites máximos de residuos.

La aparición de resistencias es otro de los problemas asociados a la masiva utilización de fungicidas de alta especificidad (Holmes y Eckert, 1999; Zhang *et al.*, 2009; Sánchez-Torres y Tuset, 2011). Esto se debe a que los fungicidas específicos interactúan con un componente único, de tal forma que una mutación puntual en éste puede teóricamente conferirle al microorganismo resistencia frente a él.

Por último, los fungicidas utilizados no son efectivos frente a todos los patógenos debido a su limitado espectro de acción. Esto lleva en algunos casos a usar mezclas de productos y además puede provocar un desequilibrio biológico favoreciendo la presencia de hongos no susceptibles. Por ejemplo, los productos TBZ, IMZ y SOPP controlan principalmente *P. digitatum* y *P. italicum*, y sin embargo no protegen frente a *B. cinerea* (Tuset *et al.*, 2000).

1.3. Estrategias alternativas de control de podredumbres postcosecha

La problemática derivada de la toxicidad de fungicidas y de sus residuos en frutos y vegetales de consumo en fresco, ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas para el control efectivo de las podredumbres postcosecha que minimicen el uso de los mismos (Barkai-Golan, 2001; Narayanasamy, 2006).

Entre las estrategias alternativas existentes se encuentran tratamientos físicos como por ejemplo baños térmicos de agua caliente y el curado (Tuset *et al.*, 1996; Nunes *et al.*, 2007), y la irradiación de los frutos con luz UV (Wilson y Wisniewski, 1994). El principal inconveniente de estos tratamientos para su aplicación comercial es la aparición de daños en el fruto.

El tratamiento de frutos cítricos con soluciones acuosas de sales inorgánicas (bicarbonato sódico, carbonato sódico o cloruro de calcio) y sales orgánicas (benzoato sódico, sorbato potásico o acetato sódico) que actúan como fungitóxicos es otro de los métodos usados para el control de las infecciones de *P. digitatum* y *P. italicum* (Smilanick *et al.*, 1999; Smilanick y Sorenson, 2001; Palou *et al.*, 2002). Muchos de estos compuestos antifúngicos han sido utilizados desde hace años como aditivos en alimentos y por tanto son reconocidos como tratamientos seguros. Sin embargo, tienen la desventaja de no impedir la esporulación del patógeno cuando se produce la infección, y estas esporas pueden contaminar el resto de frutos.

El control biológico es otra estrategia alternativa para reducir las infecciones fúngicas postcosecha. Este efecto inhibitorio se basa en distintos mecanismos (no excluyentes entre sí) en los que está implicado un microorganismo beneficioso como agente de biocontrol (BCA) o antagonista (Spadaro y Gullino, 2004). Debido a que la mayoría de las infecciones en postcosecha se producen a través de heridas, los antagonistas más eficaces serán los que las colonicen primero y así la competencia de nutrientes y/o el espacio inhiben el crecimiento del hongo patógeno. Además, los BCA pueden actuar directamente sobre el patógeno con la secreción de sustancias inhibitoras al medio ó de forma indirecta por interacciones más complejas con el huésped y el patógeno como por ejemplo la inducción de resistencia. Se han publicado varios trabajos describiendo distintas especies de levaduras y bacterias como agentes de biocontrol de hongos del género *Penicillium* (Zhang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Taqarort *et al.*, 2008).

En los últimos años, se ha comprobado que algunas de estas estrategias alternativas de control desencadenan en el fruto mecanismos de resistencia a la infección (Terry y Joyce, 2004). Se ha visto como la aplicación de tratamientos térmicos ó con luz UV, el uso de microorganismos BCA, e incluso la adición de compuestos exógenos (quitosano, ácido β -aminobutírico) sobre los frutos inducen la biosíntesis de metabolitos y proteínas asociados a mecanismos de defensa vegetales tales como fitoalexinas (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995; Arras, 1996 ; De

Hallewin *et al.*, 1999 ; Porat *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Por último, se ha determinado que la inducción de resistencia de cítricos al ataque de *P. digitatum* está relacionada con la síntesis de fenilpropanoides, entre otros (Ballester, 2007; Ballester *et al.*, 2010).

El control integrado es una estrategia basada en la combinación de algunos de estos métodos alternativos junto con la aplicación de fungicidas en dosis reducidas. Por ejemplo, la aplicación de tratamientos térmicos en forma conjunta con fungicidas o fungitóxicos de baja especificidad permitieron reducir la cantidad de fungicida utilizado en el control efectivo de podredumbres postcosecha (Tuset *et al.*, 1996; Palou *et al.*, 2002; Smilanick *et al.*, 2008). También se ha demostrado la eficacia de los BCA combinados con dosis menores de fungicidas o con otros tipos de tratamientos (temperatura y sales inorgánicas u orgánicas efectiva) para eliminar completamente el uso de fungicidas (Porat *et al.*, 2002; Spadaro *et al.*, 2004).

2. Péptidos antimicrobianos con actividad antifúngica

En este contexto nuestro grupo ha propuesto la utilización de péptidos antimicrobianos como nuevos compuestos antifúngicos que contribuyan al control de las podredumbres causadas particularmente por *P. digitatum* (López-García *et al.*, 2000; López-García *et al.*, 2002; López-García *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2007a).

Los péptidos antimicrobianos (**AMP**, del inglés "antimicrobial peptides") se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y están presentes en organismos de distinta escala filogenética, desde procariontes hasta animales y plantas superiores (Zaslouff, 2002; Brogden *et al.*, 2005; Hancock y Sahl, 2006). Incluyen péptidos y pequeñas proteínas con propiedades antimicrobianas y que han sido propuestos para el control de microorganismos patógenos en distintos ámbitos como medicina (Hancock y Sahl, 2006; Peschel y Sahl, 2006), protección vegetal (Montesinos, 2007; Marcos *et al.*, 2008) y en conservación de alimentos (Cotter *et al.*, 2005; Rydlo *et al.*, 2006). Estos han surgido como nuevas terapias

alternativas en respuesta a la baja eficacia de los antibióticos convencionales en el campo de medicina y para reducir el uso masivo de fungicidas químicos en protección vegetal.

Los AMP son un grupo diverso de péptidos que puede subdividirse en subgrupos en función de su origen, composición aminoacídica y estructura (Brogden *et al.*, 2005). En general tienen un tamaño pequeño (menos de 30-40 aminoácidos) con las siguientes características estructurales en común: 1) **composición aminoacídica** siendo los residuos mas abundantes en los AMP catiónicos (arginina y lisina) e hidrofóbicos (triptófano, fenilalanina, leucina, e isoleucina); 2) **carga neta** positiva a pH fisiológico, aunque una minoría incluye péptidos aniónicos; 3) **carácter anfipático** debido a su contenido de aminoácidos y organización estructural; 4) **estructuras y conformaciones diversas** como son hélices α ; láminas β o estructuras no convencionales (Powers y Hancock, 2003; Marcos *et al.*, 2008). Los péptidos de origen natural presentan ciertos inconvenientes para su utilización práctica que incluyen una biodisponibilidad pobre, limitado espectro de acción, toxicidad inespecífica, altos costos de producción, reducida estabilidad y baja eficacia *in vivo*. Sin embargo, su reducido tamaño permite modificar su secuencia de aminoácidos a través de un diseño racional, y por tanto mejorar sus propiedades de estabilidad, especificidad del patógeno, potencia y toxicidad. Además, posibilita su síntesis y purificación química, así como también su producción biotecnológica de forma heteróloga (Ingham y Moore, 2007). Para poder solventar estos caracteres indeseables se ha diseñado y caracterizado varios péptidos sintéticos y estructuralmente diversos que tienden a mimetizar los péptidos naturales (Marcos *et al.*, 2008). Además, estos AMP sintéticos constituyen herramientas útiles para profundizar en el conocimiento de su modo de acción.

Dentro de los péptidos naturales encontramos numerosos ejemplos que son muy activos frente a organismos fúngicos. La **melitina** y las **cecropinas** son una clase de péptidos lineales catiónicos que poseen estructuras secundarias en hélice α . La **melitina** es un péptido citotóxico de 26 aminoácidos aislado del veneno de abeja (*Aphis mellifera*), que tiene actividad citolítica inespecífica y se ha

usado como modelo estructural y funcional de interacción de péptidos líticos con membranas biológicas (Terwillinger y Eisenberg, 1982). Las **cecropinas** proceden de las hemolinfas de insectos y presentan una interesante potencia antifúngica, aunque también tienen un amplio espectro de acción contra bacterias (Hultmark *et al.*, 1980; De Lucca *et al.*, 1997). Las cecropinas tienen entre 29 y 42 aminoácidos y forman hélices α anfipáticas en ambientes hidrofóbicos como la membrana plasmática. A pesar de que se ha descrito a la membrana plasmática como la principal diana de las cecropinas, la dosis microbicida de cecropina A no afecta a células de mamíferos, por lo cual se ha demostrado que puede ser suministrados a animales de forma segura (Donlan y Costerton, 2002). La cecropina A es un fungicida efectivo frente a *Aspergillus* spp., *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum* (De Lucca *et al.*, 1997). Además, se han diseñado análogos sintéticos de cecropinas o secuencias híbridas fusionadas a otros péptidos para mejorar sus propiedades antifúngicas (Owens y Heutte, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998).

Un gran número de proteínas antimicrobianas naturales son ricas en residuos de cisteína y contienen puentes disulfuro que dan estabilidad a su estructura (Yount y Yeaman, 2006). Entre ellas se encuentran las **defensinas** que son pequeñas proteínas antimicrobianas estabilizadas con puentes disulfuro (Ganz, 2003; Hancock y Sahl, 2006; Wilmes *et al.*, 2011). Ellas forman parte de una gran familia de proteínas relacionadas que están presentes en diversos organismos (mamíferos, insectos, plantas, y hongos). Las defensinas de mamíferos contienen seis residuos de cisteína conservados que forman tres puentes disulfuro y están divididas en tres subfamilias: las α - y β -defensinas encontradas en la mayoría de especies de mamíferos y las θ -defensinas solo en *Rhesus macaques*. Además de su actividad antimicrobiana directa, en mamíferos también se han relacionado con otras actividades relacionadas con defensa como la actividad quimiotáctica para las células del sistema inmune, señalización pro-inflamatoria o unión a glicoproteínas de membrana. La mayoría de defensinas de mamíferos son activas contra la levadura patógena de humanos *Candida albicans*, y mostraron variaciones significativas de sus actividades antimicrobianas contra otros hongos.

Las **defensinas vegetales** presentan una masa molecular de alrededor de 5 kDa y poseen un patrón común de ocho residuos de cisteínas. Están estructuralmente relacionadas con las defensinas de los insectos y tienen funciones biológicas relacionadas con los sistemas de defensas de las plantas (Carvalho y Gomes, 2009; Wilmes *et al.*, 2011). Las defensinas vegetales inhiben el crecimiento de un amplio rango de hongos a concentraciones micromolares, que incluyen patógenos de plantas y humanos. Algunos ejemplos son la RsAFP1 y RsAFP2 de *Raphanus sativus*, MsDef1, MtDef2 y MtDef4 de *Medicago* spp., Dm-AMP1, DmAMP2 de *Dahlia merckii*, Psd1 de *Pisum sativum* o NaD1 de *Nicotiana alata* (Thomma *et al.*, 2002; Aerts *et al.*, 2008; Carvalho y Gomes, 2009). Además, las plantas transformadas con genes de defensina presentan fenotipos de resistencia frente a patógenos fúngicos (Broekaert *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2000). También existen otras proteínas en plantas con propiedades antifúngicas que pertenecen a la clase de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Por ejemplo, la proteína de tabaco (PR-5) conocida como osmotina tiene una actividad antifúngica fuerte y específica (Abad *et al.*, 1996).

Los hongos también producen y secretan pequeñas proteínas ricas en cisteína con propiedades antifúngicas denominadas **AFP** (del inglés "antifungal protein"). Entre los cuales se incluye a la proteína antifúngica AFP de *A. giganteus* (Nakaya *et al.*, 1990; Lacadena *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 2001`), que inhibe de forma efectiva el crecimiento de otros hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* incluyendo una amplia gama de patógenos que afectan humanos y plantas, mientras que no afecta la viabilidad de células de levaduras, bacterias, plantas y mamíferos (Meyer, 2008). También las AFP de *P. chrysogenum* (Marx *et al.*, 1995; Kaiserer *et al.*, 2003) y *A. niger* (Gun *et al.*, 1999) se incluyen dentro de la misma clase de AMP. Aunque estas proteínas antifúngicas están relacionadas desde un punto de vista estructural, presentan diferencias en su funcionalidad y especificidad antifúngica (Marx *et al.*, 2008). También es factible la producción biotecnológica de las AFP y proteínas derivadas a través de su expresión heteróloga en levaduras (Batta *et al.*, 2009; López-García *et al.*, 2010b). Las funciones biológicas de estas proteínas antifúngicas en el hongo productor están muy poco exploradas. En el hongo *P. chrysogenum* se han

identificado al menos dos AFP distintas (Rodríguez-Martín *et al.*, 2010) y una de ellas parece estar relacionada con el desarrollo asexual y la esporulación (Hegedüs *et al.*, 2011).

Las **histatinas** son un grupo separado y distinto de AMP catiónicos y lineares. Estos péptidos son aislados de la saliva humana y se ha demostrado que tienen una actividad potente fundamentalmente contra hongos, siendo poco activos contra bacterias. Su contenido alto en aminoácidos del tipo histidinas, su carácter anfipático débil y la falta de puentes disulfuro permite distinguirlos de los otros péptidos catiónicos (Xu *et al.*, 1991). La principal característica de las histatinas es su reconocida actividad fungicida contra *Candida*, aunque también resultaron activos frente a *Cryptococcus neoformans* y *A. fumigatus* (Helmerhorst *et al.*, 2001). La histatina 5 tiene una fuerte actividad fungicida contra *C. albicans* (Xu *et al.*, 1991), pero también es muy activo frente a hongos fitopatógenos como *P. digitatum* (Marcos *et al.* no publicado). **P113** es un fragmento de 12 aminoácidos derivado de histatina 5 que mantiene la acción fungicida frente a *C. albicans* (Rothstein *et al.*, 2001). Este es un ejemplo de péptido sintético que permitió identificar los motivos mínimos necesarios para la actividad antimicrobiana como también para el diseño de nuevas secuencias antifúngicas y la caracterización de su modo de acción.

En nuestro grupo se han identificado una serie de péptidos llamados genéricamente **PAFs** (de "Péptidos AntiFúngicos") a partir de una biblioteca combinatorial de hexapéptidos, y que presentan actividad selectiva frente a hongos filamentosos, incluyendo *P. digitatum* (López-García *et al.*, 2002). El hexapéptido sintético **PAF26** es un péptido antifúngico con una combinación óptima de potencia y especificidad en su acción frente a hongos filamentosos, en especial frente *P. digitatum*. En la **Figura 3** se muestra su secuencia de aminoácidos y una modelización de su estructura tridimensional. PAF26 presenta actividad antimicrobiana muy reducida frente a microorganismos procariotas como la bacteria *E. coli* y hongos unicelulares como la levadura *S. cerevisiae*. Además, PAF26 no tiene actividad citolítica contra glóbulos rojos (Muñoz *et al.*, 2006) y queratinocitos humanos (López-García *et al.*, 2007). Mediante ensayos

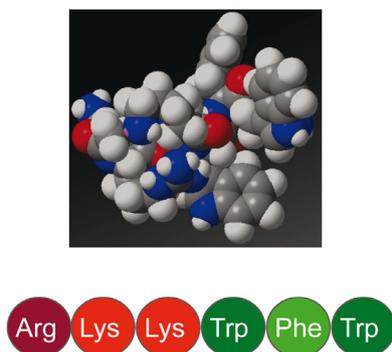


Figura 3. Estructura tridimensional y secuencia de aminoácidos del péptido PAF26.

experimentales de co-inoculación con *P. digitatum* se comprobó que PAF26 es eficiente en el control de la podredumbre postcosecha causada por este hongo (Muñoz *et al.*, 2007a). El efecto protector obtenido con PAF26 sobre frutos cítricos fue comparable al alcanzado con el uso de los fungicidas comerciales (tiabendazoles e imidazoles) (López-García *et al.*, 2003). Es importante destacar que cepas fúngicas resistentes a fungicidas comerciales son sensibles a PAF26, e incluso que su actividad *in vivo* e *in vitro* es similar frente a cepas resistentes y sensibles (López-García *et al.*, 2003).

3. Modo de acción de péptidos antifúngicos

El estudio del modo de acción de los AMP es necesario por al menos tres razones. En primer lugar, su posible utilización práctica requiere el conocimiento detallado del mecanismo de acción antimicrobiana. Además, dicho conocimiento puede ser muy útil para la identificación de nuevas dianas antimicrobianas. Finalmente, también puede guiar el diseño racional de nuevos péptidos con propiedades mejoradas mediante cambios en su secuencia de aminoácidos. De especial relevancia es el conocimiento de los procesos que le confieren selectividad frente a determinados microorganismos, y ausencia de toxicidad inespecífica frente a células no diana de animales o plantas. En el caso de péptidos activos frente a

patógenos de interés clínico existen numerosas revisiones que abordan el mecanismo de acción antimicrobiano (Zasloff, 2002; Brogden *et al.*, 2005), siendo muchas de sus generalizaciones también aplicables al campo de la fitopatología (Marcos *et al.*, 2008).

3.1. Modo de acción antifúngico no lítico

Inicialmente, el modo de acción de los AMP se ha estudiado en relación con sus propiedades estructurales. La mayoría de los AMP son catiónicos, por la presencia de residuos de arginina y lisina. A estos residuos polares se une la presencia de residuos hidrofóbicos y una predisposición a adoptar estructuras anfipáticas, lo que permite la interacción con bicapas lipídicas artificiales y, teóricamente, con las membranas lipídicas de los microorganismos. Debido a estas características el modo de acción de los AMP fue inicialmente relacionado con su capacidad de interactuar y disrumpir las membranas biológicas del microorganismo, provocando la permeabilización y lisis de las células, y por tanto la muerte celular.

Sin embargo, investigaciones posteriores demuestran que varios AMP tienen un modo de acción no-lítico sobre los microorganismos lo que indica la existencia de una serie de mecanismos alternativos (Brogden *et al.*, 2005; Brown y Hancock, 2006; Yount *et al.*, 2006). Estos incluyen la unión a componentes de membranas (Breukink *et al.*, 2003; Thevissen *et al.*, 2004a; Schneider *et al.*, 2010), la interacción con proteínas tipo chaperonas (Kragol *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2008), la inducción de daño de ácidos nucleicos (Narasimhan *et al.*, 2001; Leiter *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007a), la producción de especies reactivas de oxígeno y apoptosis (Park *et al.*, 2010; Maurya *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2011). En algunos casos estos mecanismos pueden solaparse en un mismo AMP, lo que ha llevado a proponer que estos péptidos tienen múltiples dianas celulares que dificultan de esta manera la generación de resistencia microbiana (Otvos, 2005).

De acuerdo con ello, el tratamiento con distintos AMP inducen cambios transcriptómicos específicos que no se relacionan principalmente con lisis celular (Morton *et al.*, 2007b; Vylkova *et al.*, 2007a; Lis *et al.*, 2009; López-García *et al.*,

2010a). La anotación global funcional de esos cambios inducidos avala la implicación de procesos intracelulares específicos (ver más adelante). Aunque de forma indirecta, estas observaciones son también consistentes con un modo de acción no lítico.

Resulta difícil representar un esquema general para el mecanismo de acción de esta clase de péptidos antifúngicos. Sin embargo, queda claro que el primer paso de su acción es la interacción con las envueltas celulares de los hongos (pared celular y membrana celular).

3.2. Interacción de péptidos antimicrobianos con hongos

Los péptidos deben interactuar con el microorganismo diana para ejercer su actividad antimicrobiana. Esto pone de manifiesto la importancia de la pared celular fúngica como la primera capa con la que el péptido antifúngico interactúa gracias a la atracción electrostática de los AMP catiónicos con las paredes celulares fúngicas cargadas negativamente bajo condiciones fisiológicas.

Numerosos estudios han observado ciertas alteraciones morfológicas en las células fúngicas expuestas a AMP que incluyen engrosamientos de la pared celular y de las mismas células (estructuras tipo balón), una mayor tinción con el fluoróforo Blanco de calcofluor, y cambios en los patrones de crecimiento vegetativo con hiperramificaciones del micelio o ápices dicotómicos (Cavallarin *et al.*, 1998; Ali y Reddy, 2000; Oard *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). En nuestro grupo se ha comprobado este tipo de defectos morfológicos en el micelio de *P. digitatum* expuesto al hexapéptido PAF26 (Muñoz y Marcos, 2006). Estas respuestas están relacionadas con el estrés que las células perciben, y pone de manifiesto no sólo la importancia de la pared celular en la interacción con los péptidos sino también en la protección de las células para contrarrestar la acción de los mismos.

Las proteínas PIR son específicas de pared celular en *S. cerevisiae*, y la delección de los genes correspondientes resulta en hipersensibilidad de cepas que eran tolerantes a osmotina (Yun *et al.*, 1997). Otro ejemplo está dado con el péptido antibacteriano nisina, el cual no resulta activo contra levaduras y hongos

filamentosos, pero las células sin pared celular de levaduras fueron completamente lisadas en presencia de nisina a concentraciones en las que no afectó a las células intactas (Dielbandhoesing *et al.*, 1998).

Existen ejemplos en los que la presencia de la pared celular (o componentes específicos de la pared celular) se requieren para la actividad antifúngica del péptido. La defensina de planta NaD1 requiere de una pared celular intacta para ejercer su acción antifúngica sobre el hongo *Fusarium* (van der Weerden *et al.*, 2010). Las proteínas chaperonas de la pared celular Ssa1/2p determinan la unión a la pared celular y actividad antimicrobiana del péptido histatina 5 contra *Candida* (Li *et al.*, 2003), y los β -glucanos de la pared celular también contribuyen a su unión (Jang *et al.*, 2010).

Los glucanos, la quitina y los azúcares unidos a manoproteínas son carbohidratos presentes en la pared celular de hongos. Los dominios de unión a carbohidratos están dispersos en la naturaleza y también se encuentran en proteínas antifúngicas (Fujimura *et al.*, 2005; Hagen *et al.*, 2007; Batta *et al.*, 2009). La proteína AFP de *A. giganteus* se une a quitina, inhibe su síntesis y provoca estrés de pared celular en hongos sensibles (Hagen *et al.*, 2007). Los mutantes en genes de síntesis de quitina de las clases III y V de *F. oxysporum* y *A. oryzae* fueron resistentes a esta proteína antifúngica. Un estudio independiente encontró resultados parcialmente contradictorios a esos datos, como una mayor sensibilidad de distintos mutantes de quitin-sintasas en *F. oxysporum*, y también que la unión a AFP no se correlacionó con la sensibilidad de esos mutantes a la proteína (Martín-Urdíroz *et al.*, 2009), confirmando que la unión a quitina es necesaria pero no suficiente para la actividad inhibitoria (Hagen *et al.*, 2007). Por otro lado, no se ha podido confirmar que el dominio teórico de unión a quitina de la proteína PAF de *P. chrysogenum* se una realmente a quitina, aunque tiene un papel fundamental en su toxicidad (Batta *et al.*, 2009). La función protectora de la quitina se ha comprobado en una investigación reciente, en donde la disrupción de quitin-sintasa de clase II en *S. cerevisiae* convirtió la cepa tolerante en sensible a la proteína antifúngica AFP (Ouedraogo *et al.*, 2011).

La pared celular no es la única estructura de interacción con AMP. Los glicolípidos de las membrana celulares también se han relacionado con la actividad de péptidos y proteínas antifúngicas (Aerts *et al.*, 2008). La sensibilidad de *S. cerevisiae* a distintas defensinas vegetales está mediada por la interacción con distintos glicolípidos específicos de membranas fúngicas (Thevissen *et al.*, 2003). Se comprobó que la defensina RsAFP se une a los esfingolípidos de las membranas fúngicas, y la cepa deletante de *GCS1* que participa en la biosíntesis de glucoceramidas (GlcCer) de levadura fue resistente a RsAFP2 (Thevissen *et al.*, 2004b). De forma similar, los genes *IPT1* y *SKN1* involucrados en la biosíntesis de esfingolípidos determinaron la sensibilidad de levadura a la defensina de planta DmAMP1 (Thevissen *et al.*, 2000; Thevissen *et al.*, 2005). De gran interés es que la delección de *IPT1* resulta en un aumento de resistencia no solo en defensinas de plantas, sino también a otros péptidos antifúngicos no relacionados como el hexapéptido sintético PAF26 (López-García *et al.*, 2010a). Sin embargo la función de unión a lípidos no sería la única explicación del fenotipo observado. Varias investigaciones revelan la participación de los esfingolípidos en apoptosis, respuesta al estrés oxidativo o autofagia en hongos (Aerts *et al.*, 2006; Thevissen *et al.*, 2010), indicando una función de señalización y respuesta intracelular frente a la exposición del péptido.

3.3. Internalización celular de péptidos antifúngicos

Después de interactuar y unirse a la célula, estudios recientes han demostrado que varios AMP pueden atravesar las membranas biológicas sin permeabilizarlas y translocarse dentro de la célula para ejercer su actividad antimicrobiana. Esto se ha caracterizado en péptidos antibacterianos como la apidaecina de insectos (Castle *et al.*, 1999) o la buforina II (Park *et al.*, 2000). Ambos péptidos pertenecen a la clase de AMP ricos en prolina, y son capaces de penetrar en las células susceptibles y actuar intracelularmente (Ichinomiya *et al.*, 2005).

La mayoría de los AMP presentan propiedades biofísicas similares a los péptidos tipo penetratina o **CPP** (del inglés "cell-penetrating peptides"). Los CPP entran a las células eucarióticas de una forma no disruptiva y sin citotoxicidad

aparente (Lindgren, 2000; Jarver y Langel, 2006). Existe un número creciente de AMP en los que se ha comprobado que a bajas y moderadas concentraciones entran en las células microbianas. Por ejemplo se ha demostrado actividad antimicrobiana en el caso del CPP Tat[47-58] derivado de la proteína reguladora Tat de HIV-1 y que fue antifúngico contra *Candida* spp. (Jung *et al.*, 2006).

El uso de sondas fluorescentes y microscopía confocal ha permitido constatar que distintos péptidos y proteínas antifúngicas se localizan intracelularmente en células fúngicas sensibles (Oberparleiter *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006). Así, se demostró la localización nuclear de la AFP de *A. giganteus* en *Magnaporthe oryzae* (Moreno *et al.*, 2006) y de la defensina Psd1 en *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007), y citoplasmática de la defensina NaD1 en las hifas de *F. oxysporum* (van der Weerden *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que la actividad de esas proteínas antifúngicas no se restringen sólo a la membrana celular ya que pueden afectar dianas intracelulares (ver más adelante). En todos estos ejemplos el mecanismo de translocación no ha sido estudiado en profundidad. Existe una controversia respecto a si la internalización celular está relacionada con la actividad antimicrobiana o sólo es una propiedad poco común en una clase restringida de AMP (Henriques *et al.*, 2006; Dupres *et al.*, 2009; Marcos y Gandía, 2009; Nicolas, 2009; Jiang *et al.*, 2012). En cualquier caso, los AMP con propiedades de internalizarse en los microorganismos tienden a ser más específicos y se ha propuesto llamarlos **CP-AMP**.

La histatina 5 es uno de los péptidos cuya internalización celular se ha asociado con su acción antifúngica sobre *C. albicans*. Un fragmento inactivo de histatina 5 se une a la pared celular de *C. albicans* pero no es translocado dentro de la célula, indicando que la unión a la pared celular es necesaria pero no suficiente para la internalización celular (Jang *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado la existencia en la chaperona Ssa2p de pared celular de un dominio funcional de unión a histatina 5 y que es necesario para la internalización del péptido y actividad fungicida (Sun *et al.*, 2008). La entrada de histatina 5 no implica la disrupción de la integridad de la membrana celular y precede al ingreso del marcador de muerte celular (Mochon y Liu, 2008; Jang *et al.*, 2010). Se ha

propuesto la función de retención vacuolar para limitar la toxicidad del péptido, aunque existen ciertas controversias (Mochon y Liu, 2008; Jang *et al.*, 2010). Existen otros AMP sintéticos que se localizan intracelularmente, como Sub5 en *A. nidulans* (Mania *et al.*, 2010) o VS2 y VS3 en *C. albicans* (Maurya *et al.*, 2011). Todos esos péptidos son catiónicos y contienen un número significativo de residuos aromáticos (triptófano y fenilalanina).

El hexapéptido antifúngico **PAF26** se incluye dentro de esta categoría de CP-AMP. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el péptido marcado con la sonda fluorescente FITC interacciona con las envueltas celulares de los conidios e hifas del hongo *P. digitatum* y luego ingresa en el interior de las células fúngicas a concentraciones sub-inhedoras (Muñoz *et al.*, 2006) (**Figura 4**).

El mecanismo preciso por el cual esos AMP se translocan a través de la membrana aún permanece desconocido. En la internalización de estos péptidos participarían dos procesos que coexisten probablemente, tal y como se lo ha demostrado con CPP: la internalización endocítica en endosomas y vacuolas, y la difusión directa hacia el citoplasma. Seguramente, el mecanismo varía de péptido a péptido y depende de la concentración local del mismo. En varios estudios de internalización, la endocitosis se ha demostrado en base a dependencia de la temperatura, el uso de inhibidores específicos o la co-localización con sondas endocíticas (Oberparleiter *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Mochon y Liu, 2008). En

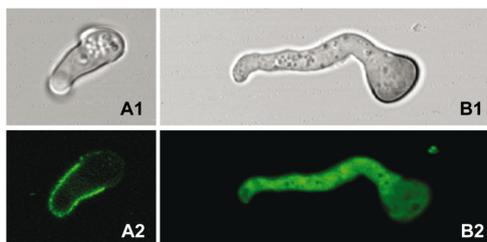


Figura 4. Visualización de la interacción del péptido FITC-PAF26 con *P. digitatum*.

Se muestran fotografías obtenidas por microscopía confocal láser de conidios germinando (A y B) tratados con concentraciones sub-inhedoras ($0,3 \mu\text{M}$) del péptido durante 2 min (Muñoz, 2008).

el caso de la histatina 5, las observaciones microscópicas del péptido internalizado en mutantes en genes de rutas endocíticas y la cinética de localización sugieren un proceso endocítico (Mochon y Liu, 2008; Jang *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha caracterizado la cinética de la interacción e internalización de PAF26 en el hongo modelo *N. crassa* por microscopía confocal (Muñoz *et al.*, 2012). Este estudio ha demostrado que el péptido PAF26 marcado con fluorescencia tiene un proceso de internalización que es dependiente de su concentración. A bajas concentraciones sub-inhedorias, primero interacciona con la superficie celular, seguidamente se internaliza en las células fúngicas vía endocitosis, acumulándose en orgánulos intracelulares (vacuolas) y luego es transportado activamente hacia el citoplasma coincidiendo con la muerte celular. A concentraciones por encima de valores totalmente inhibitorios se transloca pasivamente a través de la membrana plasmática y ejerce su actividad fungicida por un proceso independiente de energía.

3.4. Muerte intracelular

Una vez dentro de la célula, los CP-AMP podrían perturbar funciones intracelulares. Debido a su naturaleza catiónica, la mayoría de los AMP se unen fácilmente a los ácidos nucleicos y en algunos casos se ha demostrado que provocan la inhibición de la síntesis de DNA, la transcripción y/o transducción de mRNA (Moreno *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2007a).

Los hongos reaccionan mediante distintas respuestas intracelulares ante la presencia de AMP. Esta señalización, no depende necesariamente de la internalización del péptido, ya que puede activarse como respuesta al péptido sin internalizarse en la célula fúngica ni permeabilizar la membrana. Distintos estudios indican que dichas respuestas podrían estar relacionadas con el mecanismo de acción antimicrobiano del péptido o ser parte de mecanismos de defensa para contrarrestar su efecto deletéreo. En cualquier caso, varias investigaciones indican la existencia de componentes de señalización celular que coordinan esas respuestas. Por ejemplo, se requiere un receptor de membrana plasmática para la sensibilidad de levadura a osmotina (Narasimhan *et al.*, 2005). Distintas cascadas

de señalización de proteínas quinasas fúngicas relacionadas con la integridad de la pared celular y el estrés osmótico median la respuesta a distintos AMP y proteínas, y mutaciones en los correspondientes genes resultan en una mayor sensibilidad (Koo *et al.*, 2004; Ramamoorthy *et al.*, 2007; Vylkova *et al.*, 2007a). Esto último indica que dichos componentes de señalización son parte de la respuesta microbiana a la exposición del péptido, y no necesariamente a su acción antimicrobiana. Varios estudios independientes indican que ciertos AMP específicos (tales como dermaseptina de rana, lactoferrina humana, osmotina de tabaco o AFP fúngica) inducen apoptosis en levaduras o hongos filamentosos (Narasimhan *et al.*, 2001; Leiter *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007a; Andrés *et al.*, 2008). Otros estudios también han demostrado que ciertos AMP inducen la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que también sugiere señalización intracelular. Estos incluyen péptidos derivados de la lactoferrina humana (Lupetti *et al.*, 2002), la defensina de plantas RsAFP2 (Aerts *et al.*, 2007), los péptidos diseñados *de novo* VS2 y VS3 (Maurya *et al.*, 2011) e incluso PAF26 (Carmona *et al.*, 2012).

Investigaciones recientes han demostrado también la participación de la señalización vía calcio con distintos péptidos y debido a que este proceso juega un papel fundamental en la biología celular de los hongos está adquiriendo importancia como una posible diana intracelular. Un estudio transcriptómico reveló que la señalización calcio/calcineurina participa en la sensibilidad de *Candida* frente un dodecámero del péptido MUC2 (Lis *et al.*, 2010). Además, un estudio reciente con la AFP de *A. giganteus* demostró que el refortalecimiento de la pared celular con quitina depende de la señalización vía calcio/Crz1p (Ouedraogo *et al.*, 2011). También se comprobó que la proteína antifúngica PAF de *P. chrysogenum* o PAF26 perturban la homeostasis de Ca^{2+} citosólico en *N. crassa* (Binder *et al.*, 2010a; Muñoz *et al.*, 2012).

El uso de herramientas genómicas contribuye a la caracterización del modo de acción AMP. En estudios recientes se han evaluado la respuesta transcriptómica de levaduras frente a distintos AMP a concentraciones inhibitorias (Morton *et al.*, 2007b; Lis *et al.*, 2009) o sub-inhibitorias (López-García *et al.*, 2010a). Un análisis

transcriptómico reveló que genes involucrados en la biosíntesis y refortalecimiento de la pared celular se inducen como una respuesta común de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a dos AMPs con distinto modo de acción, siendo uno de ellos PAF26 y el otro melitina (López-García *et al.*, 2010a). Entre estos genes se encuentran los que codifican para proteínas estructurales de la pared celular como *PIR2*, *PIR3* o *ECM33*. Por otro lado, cinco genes (*ARG1*, *ARG3*, *ARG4*, *ARG5*, *ARG7*) que participan en el metabolismo de la arginina se inducen específicamente por el tratamiento con PAF26 y no con melitina (López-García *et al.*, 2010a). La biogénesis ribosomal y la respuesta al estrés de proteínas mal plegadas fueron otros de los procesos intracelulares que resultaron relevantes en la respuesta a estos péptidos antimicrobianos (López-García *et al.*, 2010a).

En base a estos precedentes, en esta tesis se ha planteado la caracterización detallada de la interacción e internalización de PAF26 sobre la levadura modelo *S. cerevisiae* y la evaluación de la importancia de la pared celular y de genes relacionados con el metabolismo de la arginina para la actividad antifúngica del péptido.

4. La pared celular de los hongos

La **pared celular** es un orgánulo complejo, dinámico y flexible que es imprescindible para el cumplimiento de múltiples funciones en los hongos. Entre estas funciones se destacan el mantenimiento de la forma y la integridad de las células fúngicas, protegiéndolas frente a distintos tipos de estrés ambiental, y el mantenimiento de la homeostasis celular (De Groot *et al.*, 2005; Bowman y Free, 2006; Klis *et al.*, 2006; Klis *et al.*, 2007).

En la levadura *S. cerevisiae* se estima que el 20 % de todos sus genes están involucrados directa o indirectamente en la formación de la pared celular (De Groot *et al.*, 2001). La organización de los componentes de la pared celular en este organismo modelo se ha estudiado ampliamente (Klis *et al.*, 2006; Klis *et al.*, 2007). La estructura básica de la pared celular es una red bastante compleja que está constituida principalmente por una matriz de polisacáridos (quitina y

glucanos) que se encuentran interconectados entre sí y unidos a su vez con proteínas (glicoproteínas y manoproteínas) (De Groot *et al.*, 2005; Bowman y Free, 2006; Cummings y Doering, 2009). El componente predominante son los β -1,3-glucanos (50 %), aunque también puede presentar algunos polímeros de glucosa con enlaces alternativos como β -1,6-glucanos (10 %). La quitina es el polisacárido menos abundante (1-3 %) y está formado a partir de residuos de N-acetilglucosamina con enlaces β -1,4-glucosídicos (Klis *et al.*, 2007). Las manoproteínas presentes en la pared celular están unidas covalentemente con carbohidratos mediante N- y O-glicosilación (De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006). Además, algunas glicoproteínas contienen un anclaje tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las proteínas constituyen del 30 al 50 % del peso seco de levaduras (De Groot *et al.*, 2003).

A pesar de las características generales comunes, la estructura y composición de la pared celular varía según la especie fúngica, ya que existen diferencias entre lo caracterizado en *S. cerevisiae* y los hongos filamentosos (**Figura 5**) como *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Ustilago maydis* (Fontaine *et al.*, 2000;

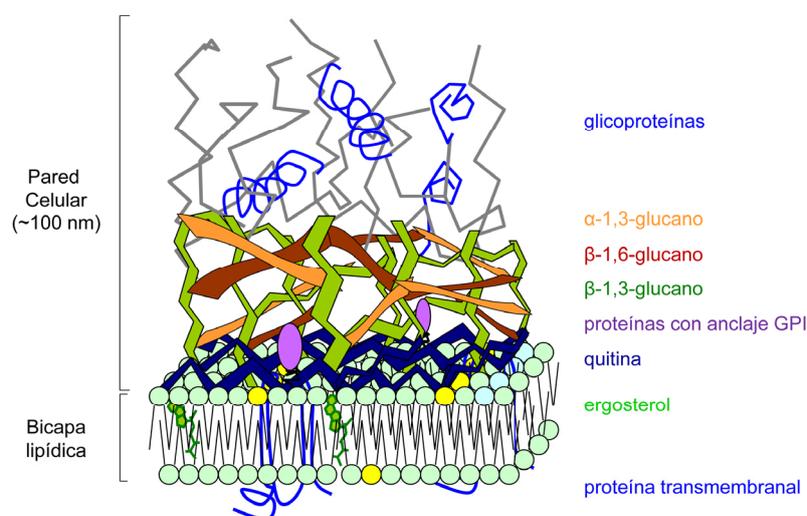


Figura 5. Estructura y composición de la pared celular de hongos filamentosos. Tomado de (Muñoz, 2008).

Ruíz-Herrera *et al.*, 2008; De Groot *et al.*, 2009; Ruíz-Herrera y Ortíz-Castellanos, 2010). Una de las diferencias más destacadas es el mayor contenido de quitina (15 %) en los hongos filamentosos, lo que está relacionado con una mayor rigidez de la pared celular del micelio. Los hongos filamentosos también contienen polímeros adicionales como α -1,3-glucanos. La pared celular de *A. fumigatus* también contiene α -1,4-glucanos y galactomananos con cadenas laterales de galactofuranosa y no tiene β -1,6-glucanos (Fontaine *et al.*, 2000; Latgé *et al.*, 2005). Por otro lado, los mananos en *A. fumigatus* también se encuentran directamente unidos a glucanos sin necesidad de intermediarios peptídicos como el caso de levaduras (De Groot *et al.*, 2005; Latgé, 2007).

La composición de la pared celular de los hongos es distinta a la de organismos eucarióticos superiores como humanos y plantas, lo que la convierte en una excelente diana para el desarrollo de compuestos antifúngicos (Odds *et al.*, 2003; Aimanianda y Latgé, 2010). Las equinocandinas son lipopéptidos cíclicos antifúngicos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular de una forma no competitiva inhibiendo la enzima β -1,3-glucano sintasa (Fksp), que está presente en los hongos y ausente en humanos, por lo que es de gran interés en el ámbito clínico (Debono y Gordee, 1994; Denning, 2002). La equinocandina B producida por *A. nidulans* y *A. rugulosus* presenta una fuerte actividad antifúngica contra *Candida* spp. (Francois *et al.*, 2005). Sin embargo, es hemolítica por lo que tiene una característica indeseable como antifúngico. Debido a ello, se han desarrollado una serie de análogos más eficaces a la equinocandina ya disponibles en el mercado que tienen un perfil de acción más seguro para uso clínico (Denning, 2002). Entre éstos se encuentran la micafungina, caspofungina y anidulafungina (Cowen y Steinbach, 2008). El blanco de calcofluor (CFW) es otra clase de compuesto antifúngico que ejerce su acción sobre la pared celular de los hongos a través de la unión con la quitina de las células fúngicas y que se ha usado frecuentemente para caracterizar mutantes en genes relacionados con la síntesis e integridad de la pared celular (Ram y Klis, 2006). La mayoría de las proteínas de pared celular que fueron inducidas por el hexapéptido antifúngico PAF26 (López-García *et al.*, 2010a), tienen numerosos sitios potenciales de glicosilación. Resulta

interesante destacar que varios estudios han demostrado que mutantes en genes de glicosilación de proteínas como *MNN1*, *MNN4*, *MNN5* y *MNN6* fueron resistentes a varios péptidos y proteínas antifúngicas (Ibeas *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009). Esto denota la importancia de una correcta glicosilación de proteínas para la completa actividad de numerosos péptidos y proteínas antifúngicas. Estudios recientes de nuestro grupo han encontrado que varios genes de glicosilación participan en la sensibilidad de *S. cerevisiae* (datos aún no publicados). Principalmente, los mutantes $\Delta mnn5$, $\Delta alg5$, $\Delta eos1$ y $\Delta pmt2$ mostraron fenotipos resistentes al péptido.

Por todo lo expuesto, en esta tesis también se ha propuesto el análisis de la implicación de la glicosilación de proteínas en la susceptibilidad de la levadura modelo frente a PAF26.

5. La glicosilación de proteínas

La **glicosilación de proteínas** es la modificación post-transcripcional más universal y a la vez estructuralmente diversa. La correcta glicosilación es necesaria tanto para la estabilidad, correcto plegamiento y/o actividad de muchas proteínas en general, como para la secreción y localización de las glicoproteínas en la pared celular (Deshpande *et al.*, 2008). La glicosilación de proteínas se ha caracterizado ampliamente en *S. cerevisiae* como organismo modelo (Strahl-Bolsinger y Tanner, 1991; Lussier *et al.*, 1995; Gentzsch y Tanner, 1997; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999; Ernst y Prill, 2001). La unión y procesamiento de los residuos glucosídicos a la proteína se realiza durante su síntesis en el retículo endoplasmático (ER) y paso por el aparato de Golgi. Existen dos tipos de glicosilación de proteínas según la unión del glicano se produzca vía el aminoácido amidado de asparagina (N-glicosilación) o los aminoácidos hidroxilados de serina o treonina (O-glicosilación). Las estructuras de los glicanos resultantes son sustancialmente diferentes en ambos casos. Los procesos de N- y O-glicosilación están conservados en los organismos eucariotas (Deshpande *et al.*, 2008). También se han realizado numerosas investigaciones para conocer la batería de genes que participan en las

rutas biosintéticas de N- y O-glicanos en hongos patógenos de humanos como *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*, así como también en el hongo fitopatógeno *U. maydis* (Klutts, 2006; Mora-Montes *et al.*, 2009; Fernández-Álvarez *et al.*, 2010; Jin, 2012).

5.1. Síntesis de N-glicanos

En todos los eucariotas, la N-glicosilación ocurre en tres etapas secuenciales (Lehle *et al.*, 2006). Las dos primeras tienen lugar en el retículo endoplasmático (ER) con la participación de numerosas enzimas y la síntesis de un oligosacárido precursor ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$) (**Figura 6**). Una vez sintetizado, este precursor se transfiere desde el dolicol fosfato al residuo de asparagina de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína en síntesis (**Figura 6**).

El dolicol fosfato manosa (Dol-P-Man) es el sustrato que provee los residuos necesarios para la adición de manosas en los dos tipos de glicosilación de proteínas (N- y O-glicosilación) así como también para la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Orlean, 1990). La última etapa de la síntesis de N-glicanos tiene lugar en el aparato de Golgi. En la **Figura 7** se representan las etapas del procesamiento de la proteína glicosilada en el Golgi, que consiste en la elongación de sus cadenas con residuos de manosas (alrededor de 200) y da como resultado una estructura final bastante compleja e hipermanosilada en *S. cerevisiae* (Lehle *et al.*, 2006). En varios estudios se ha propuesto que la estructura de los N-glicanos es más sencilla en hongos filamentosos y difiere de lo caracterizado en levaduras. En *U. maydis* no se han encontrado homólogos de los complejos Man-Pol-I y -II (**Figura 7**) indicando que la extensión y elongación de los N-glicanos es más sencilla (Fernández-Álvarez *et al.*, 2010). En *A. fumigatus* se ha descrito que la forma predominante del N-glicano en la glicoproteína madura es $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$, siendo similar al de humanos (Jin, 2012).

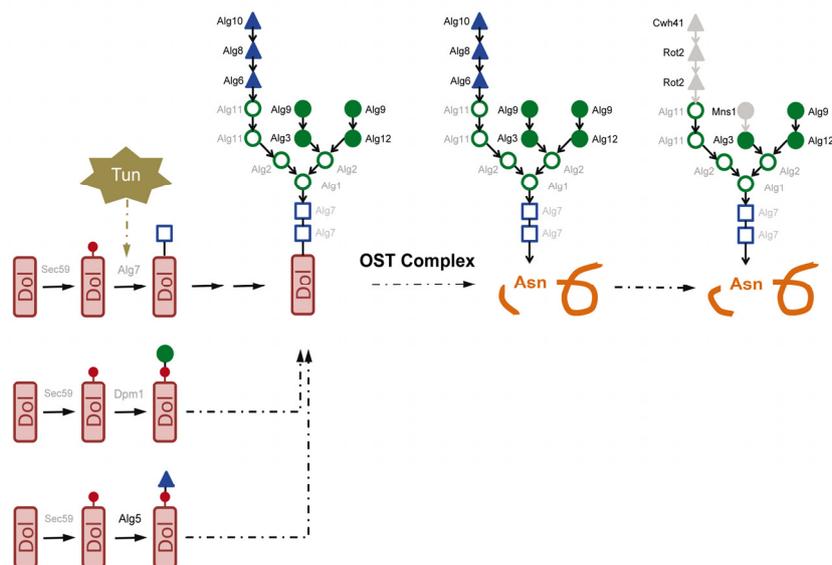


Figura 6. Ruta biosintética de los N-glicanos de *S. cerevisiae* en el ER.

El dolicol fosfato es sintetizado por la enzima Sec59p y luego se le incorpora secuencialmente un residuo de N-acetilglucosamina (cuadrados azules), manosa (círculo verde) y glucosa (triángulo azul). Nótese el sitio de acción de tunicamicina (Tun). Mediante la acción consecutiva de varias manosiltransferasas y glucosiltransferasas se sintetiza el oligosacárido precursor unido al dolicol compuesto de 14 monosacáridos. Dos residuos de N-acetilglucosamina y cinco residuos de manosas se unen en el lado citosólico de la membrana de ER (símbolos vacíos). Luego, se incorporan cuatro manosas y tres glucosas en el lumen del ER (símbolos rellenos). Este precursor sintetizado se transfiere al residuo de asparagina de la proteína en síntesis por el complejo de oligosacariltransferasas (OST). Seguidamente, se eliminan las glucosas por acción de glucosidasas (triángulos grises) y un residuo de manosa por una manosidasa (círculo gris). Finalmente esta glicoproteína sale del ER. Los nombres de los genes colocados en gris son esenciales en levadura (Lehle *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae* se ha comprobado que la disrupción de la mayoría de genes *ALG* tuvo efectos negativos sobre el crecimiento y la división celular demostrando la importancia de los N-glicanos para el crecimiento y la regulación del ciclo celular en levadura (Kukuruzinska y Lennon-Hopkins, 1999). Además, se han relacionado con la secreción correcta de proteínas (Helenius y Aebi, 2004). En *C. albicans* se ha demostrado la participación de la N-glicosilación en su virulencia. La disrupción de manosiltransferasas *MNW5* o glucosidasas como *CWH41*, *ROT2*,

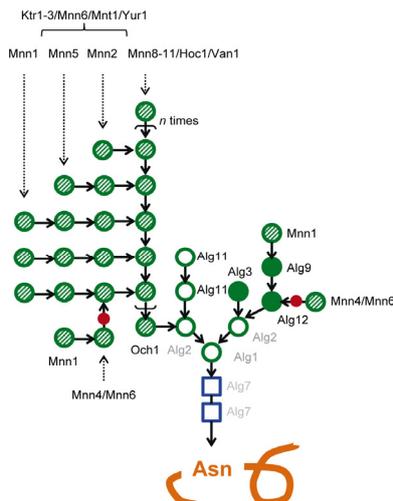


Figura 7. Procesamiento de los N-glicanos de *S. cerevisiae* en el aparato de Golgi. Comienza con la adición de un residuo de manosa a la proteína glicosilada por acción de una manosiltransferasa (Och1p) y continúa con la ramificación del N-glicano por la actividad de dos complejos enzimáticos: Manano Polimerasa I (M-Pol I: Mnn9p y Van1p) y II (M-Pol II: Mnn9p, Van1p, Mnn10p y Mnn11p, Hoc1p). Luego, sufre varias modificaciones que incluyen la incorporación de manosas y manosilfosfatos por acción de manosiltransferasas (Mnn2p y Mnn5p) y manosilfosfatasas (Mnn4p y Mnn6p); y sigue ramificándose con la actividad enzimática de manosidasas de la familia génica *MNV1* o manosiltransferasas de la familia génica *KTR* (Lehle *et al.*, 2006). Los círculos verdes representan los residuos de manosas, el círculo pequeño rojo son los fosfatos y los símbolos rallados corresponden a su localización en el Golgi.

MNS1 resultaron en fenotipos de virulencia reducida (Bai *et al.*, 2006; Mora-Montes *et al.*, 2007).

La pérdida de *ALG7* implicado en la transferencia de los residuos de N-acetilglucosamina al dolicol fosfato resultó en un fenotipo letal (Knauer y Lehle, 1999; Kukuruzinska y Lennon-Hopkins, 1999). Además, se ha comprobado que este paso de N-glicosilación es inhibido por el antibiótico tunicamicina (Kukuruzinska y Lennon, 1994) (**Figura 6**). Una reciente investigación ha demostrado que el gen *EOS1* (del inglés "ER-localized and Oxidants Sensitive gene") también participa de alguna forma en la N-glicosilación ya que el mutante $\Delta eos1$ tuvo un fenotipo resistente a tunicamicina y alteraciones en la glicosilación

de proteínas (Nakamura *et al.*, 2007). Su función también se ha relacionado con otros procesos celulares como el estrés oxidativo, la homeostasis de zinc y la tolerancia a equinocandinas (Lesage *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2010). Además, cabe resaltar que en nuestro grupo se demostró que la cepa deletante $\Delta eos1$ tuvo un fenotipo resistente al péptido PAF26 (datos aún no publicados).

Existen pocas investigaciones sobre las funciones de la N-glicosilación en hongos filamentosos. En *A. fumigatus* se ha comprobado que este proceso participa en su morfogénesis y crecimiento polarizado. La disrupción de la manosiltransferasa *OCH1* o de las manosidasas *MSDS (MNS1)* en *A. fumigatus* mostró una reducción en esporulación y polaridad anómala, aunque no tuvieron efectos negativos sobre la virulencia de este patógeno (Li *et al.*, 2008; Kotz *et al.*, 2010). Hasta la fecha, solo un gen de N-glicosilación, *ALG2*, se ha relacionado con la patogénesis de un hongo fitopatógeno. El mutante $\Delta alg2$ de *Mycosphaerella graminicola* tuvo un fenotipo no patogénico sobre trigo (Motteram *et al.*, 2011).

5.2. Síntesis de O-glicanos

Los O-glicanos unidos a proteínas fueron identificados en los años 1960's en *S. cerevisiae* (Sentandreu y Northcote, 1968). Durante mucho tiempo se ha considerado que la **O-glicosilación** de proteínas estaba restringida a los hongos. Sin embargo, ahora se sabe que es un proceso conservado en el reino animal e incluso en procariotas (Lehle *et al.*, 2006; Lommel y Strahl, 2009). Recientemente, este proceso se ha caracterizado detalladamente en hongos filamentosos (Goto, 2007; Deshpande *et al.*, 2008; Lengeler *et al.*, 2008).

En la **Figura 8** se representa la estructura de los O-glicanos en *S. cerevisiae* formados por una cadena de cinco residuos de manosa, dando lugar a una estructura bastante simple en comparación a los N-glicanos. La familia génica *PMT* (del inglés "Protein O-Mannosyltransferases") transfieren el primer residuo de manosa del Dol-P-Man al residuo de serina o treonina de la proteína en el lumen del ER (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Los genes *PMT* son críticos en el

proceso de O-glicosilación. El primer gen *PMT1* fue identificado en *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger y Tanner, 1991), y subsiguientemente otros *PMT* (ver más abajo) y en otros hongos (Lommel y Strahl, 2009). En animales, los genes *PMT* fueron identificados en *Drosophila melanogaster* (Martín-Blanco y García-Bellido, 1996) y luego en humanos (Jurado *et al.*, 1999). Todos los miembros de la familia *PMT* se clasifican en la familia de glicosiltransferasas 39 (GT39) (<http://www.cazy.org>). Curiosamente, no se han encontrado en los genomas de plantas. Este O-glicano naciente sufre un posterior procesamiento en el aparato de Golgi. El segundo y tercer residuo de manosa se transfieren desde GDP-manosa hacia el O-glicano por la actividad de α -1,2-manosiltransferasas (Ktr1p, Ktr3p y Mnt1p). Finalmente, se incorpora el cuarto y quinto residuo de manosa por la acción de α -1,3-manosiltransferasas (Mnn1p, Mnt2p, Mnt3p) (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

La O-glicosilación de proteínas es similar en otros hongos aunque con pequeñas variaciones (**Figura 8**). En el caso de la levadura *S. pombe* presentan además residuos de galactosa unidos al tercer residuo de manosa en el O-glicano (**Figura 8**) (Gemmill y Trimble, 1999a, b). Por otro lado, los O-glicanos de hongos

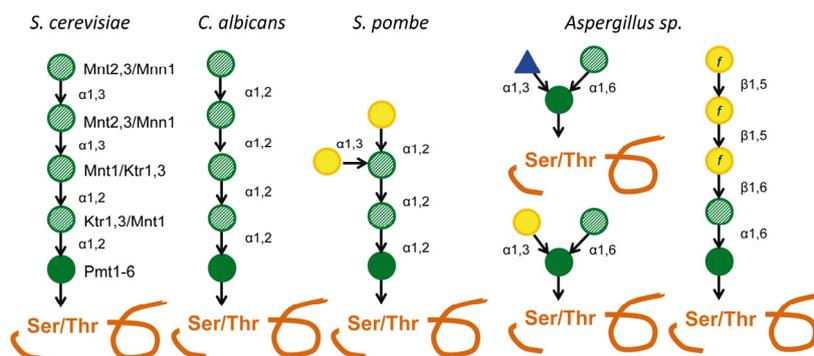


Figura 8. Estructuras típicas de los O-glicanos sintetizados en distintos hongos.

En el ER, la familia PMT transfiere el primer residuo de manosa a los residuos de serina y treonina de la proteína en síntesis. Luego, varias manosiltransferasas producen la elongación de los O-glicanos en el aparato de Golgi. Esquemáticamente los círculos verdes son los residuos de manosa, círculos amarillos representan los residuos de galactosa o galactofuranosa (f) y triángulos azules son los residuos de glucosaminas. Nótese la variación en la forma de los O-glicanos sintetizados en cada hongo.

del género *Aspergillus* (**Figura 8**) están formados generalmente por cadenas cortas de tres residuos de manosas unidos a la estructura central con enlaces α -1,2- y α -1,6-glucosídicos (Oka *et al.*, 2005) o ramificados con residuos de glucosa, galactosafuranosa o galactopentosas (Goto *et al.*, 1999; Goto, 2007). La estructura de los O-glicanos en *A. fumigatus* también contienen un número variable de residuos de galactofuranosas unidos a las cadenas de manosas con enlaces β -1,6- y β -1,5-glucosídicos constituyendo los galactomananos (Leitão *et al.*, 2003).

La familia génica de manosiltransferasas de proteínas (**PMT**) que catalizan la primera reacción de O-glicosilación en el ER está formada por seis proteínas en *S. cerevisiae* (ScerPmt1p-ScerPmt6p) y se encuentra dividida en tres subfamilias PMT1, PMT2 y PMT4 (Strahl-Bolsinger y Tanner, 1991; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993; Gentsch *et al.*, 1995; Immervoll *et al.*, 1995; Lussier *et al.*, 1995). Las subfamilias PMT1 y PMT2 son redundantes ya que contienen cada una más de un miembro, mientras que sólo un miembro está presente en la subfamilia PMT4 (Gentsch y Tanner, 1996). Los miembros de la subfamilia PMT1 (ScerPmt1p y ScerPmt5p) tienen 53 % de identidad de secuencia aminoacídica y un 65 % los de la subfamilia PMT2 (ScerPmt2p, ScerPmt3p y ScerPmt6p) (Lommel y Strahl, 2009). Los miembros de las subfamilias PMT1 y PMT2 forman complejos heterodiméricos, mientras que la subfamilia PMT4, actúa como un complejo homomérico (**Figura 9**) (Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach y Strahl, 2003). Además, los miembros de una misma subfamilia pueden interactuar entre sí bajo ciertas condiciones fisiológicas como un mecanismo compensatorio para garantizar la O-glicosilación de proteínas (Girrbach y Strahl, 2003). La formación de dichos complejos es importante para la funcionalidad de las PMT y la especificidad de sustrato (Girrbach *et al.*, 2000; Proszynski *et al.*, 2004; Hutzler *et al.*, 2007).

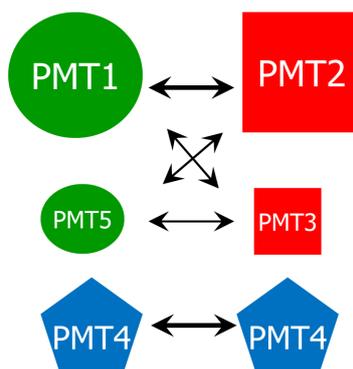


Figura 9. Formación de complejos heterodiméricos entre las subfamilias PMT1 y PMT2 y de homómeros en la subfamilia PMT4.

Cada subfamilia están representados con diferente forma y color: PMT1 (círculos verdes); PMT2 (cuadrados rojos) y PMT4 (pentágonos azules). Adaptado de (Girrbach y Strahl, 2003).

La topología de ScerPmt1p se muestra en la **Figura 10**. Se ha demostrado que es una glicoproteína integral de membrana del ER con siete regiones transmembranas, las cuales están conservadas en todas las proteínas PMT (Strahl-Bolsinger y Scheinost, 1999). La región amino-terminal de ScPmt1p está orientada hacia el lado citoplasmático y la región carboxi-terminal hacia el lumen del ER. Se forman dos bucles hidrofílicos orientados hacia el lumen del ER entre dos regiones transmembrana (TM) bien definidas y que contienen dominios conservados en las Pmtp. Un estudio de mutaciones en el Bucle 1 demostró que los aminoácidos Arg64, Asp77 y Glu78 son cruciales para la unión al sustrato y actividad enzimática de manosiltransferasa, y el motivo DEx forma parte del dominio catalítico PMT de las Pmtp (Girrbach *et al.*, 2000). La presencia de arginina (Arg138) en la segunda región transmembrana es esencial para la formación y estabilidad del complejo Pmt1pPmt2p (Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach y Strahl, 2003). Por otro lado, dentro de la región central hidrofílica (Bucle 5) está el dominio conservado MIR (proveniente de manosiltransferasa-receptores de rianodina inositol trifosfato) que es usado para la identificación de homólogos de otras especies fúngicas (Girrbach *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005; Willer *et al.*, 2005; Kriangkripipat y Momany, 2009; Willger *et al.*, 2009). Este dominio MIR presenta tres subdominios conservados

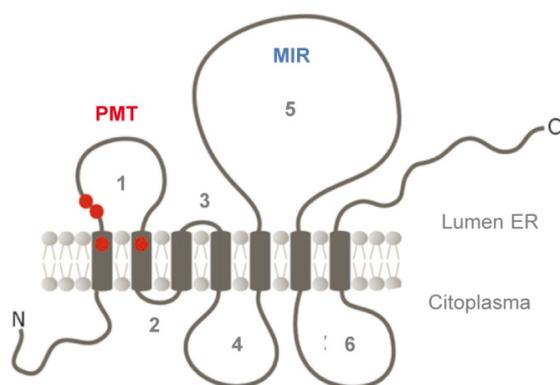


Figura 10. Modelo de la topología de la proteína ScerPmt1p.

Nótese la localización de los dominios PMT y MIR en los bucles hidrofílicos 1 y 5. En rojo se indican dos residuos Arg conservados en las regiones transmembranas, y Asp-Glu necesarios para su actividad enzimática. Adaptado de (Lommel y Strahl, 2009).

Motivos A, B y C. Además, dentro del subdominio A de Pmt4p existe una inserción de siete aminoácidos, que no existe en ninguna de las otras dos subfamilias (Girrbach y Strahl, 2003; Olson *et al.*, 2007).

El estudio fenotípico de las cepas deletantes *PMT* de *S. cerevisiae* ha permitido caracterizar las funciones de estas proteínas. Los mutantes simples ($\Delta pmt1-6$) fueron viables, mostrando fenotipos de velocidad de crecimiento reducida y mayor sensibilidad a compuestos desestabilizantes de la pared celular (Gentzsch y Tanner, 1996). Los dobles mutantes ($\Delta pmt2pmt3$, $\Delta pmt2pmt4$) sólo crecieron con estabilización osmótica, mientras que los triples mutantes ($\Delta pmt1pmt2pmt4$ y $\Delta pmt2pmt3pmt4$) fueron letales (Gentzsch y Tanner, 1996). Esto refleja que la O-glicosilación de proteínas es un proceso esencial para la rigidez e integridad de la pared celular (Gentzsch y Tanner, 1996). Además, se ha demostrado que precede y controla la N-glicosilación en este organismo (Ecker *et al.*, 2003).

Existen varias investigaciones que han demostrado la implicación de la familia PMT en el desarrollo morfológico y la virulencia de hongos patógenos. A diferencia de lo encontrado en *S. cerevisiae*, la familia génica PMT es menos

redundante en otras especies fúngicas (**Tabla 3**). En el hongo patógeno *C. albicans* se han identificado cinco manosiltransferasas de proteínas, cuyas mutaciones $\Delta pmt2$ y $\Delta pmt2pmt4$ fueron letales (Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Los mutantes *PMT* de *C. albicans* mostraron defectos en la formación de hifas, mayor sensibilidad a compuestos antifúngicos y una virulencia reducida (Prill *et al.*, 2005). En *S. pombe* y *C. neoformans* solo se han identificado un miembro para cada subfamilia *PMT* (Willer *et al.*, 2005; Willger *et al.*, 2009). En ambos organismos, la disrupción del gen *PMT2* fue letal. Los mutantes en los genes *OMA1* y *OMA4* de *S. pombe* que fueron homólogos a *PMT1* y *PMT4* de *S. cerevisiae*, presentaron una mayor sensibilidad a compuestos antifúngicos y defectos en la separación celular y en la formación de septos (Tanaka *et al.*, 2005; Willer *et al.*, 2005). La disrupción del gen *PMT4* de *C. neoformans* influyó negativamente sobre la morfogénesis y la virulencia de este patógeno fúngico (Olson *et al.*, 2007).

En estudios previos con hongos filamentosos se ha demostrado que la familia génica *PMT* de *A. nidulans* y *A. fumigatus* está compuesta solamente por tres miembros individuales para cada subfamilia (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009; Fang *et al.*, 2010; Mouyna *et al.*, 2010). La disrupción del gen *PMTA* (homólogo a *ScerPMT2*) no es letal en *A. nidulans* y *A. awamori* contrariamente a lo encontrado en *A. fumigatus* (Fang *et al.*, 2010). Los fenotipos de los mutantes $\Delta pmtB$ ($\Delta pmt1$), $\Delta pmtA$ ($\Delta pmt2$), y $\Delta pmtC$ ($\Delta pmt4$) en *A. nidulans* mostraron crecimiento reducido, hipersensibilidad a CFW y defectos en morfogénesis (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009). Las mutaciones *PMT1* y *PMT4* que fueron viables en *A. fumigatus* no tuvieron efecto negativo en la virulencia de este hongo patógeno, a pesar de que el mutante $\Delta pmt4$ presentó defectos severos de crecimiento (Zhou *et al.*, 2007; Mouyna *et al.*, 2010). En el genoma del hongo fitopatógeno *U. maydis* se han identificado sólo tres miembros de la familia *PMT* y el mutante $\Delta pmt4$ no fue patogénico sobre maíz y presentó una formación anormal de apresorios (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009).

En base a la reconocida importancia de las proteínas *PMT* en distintos procesos biológicos de los hongos (**Tabla 3**), en esta tesis también se ha abordado

Tabla 3. Funciones relacionadas con las manosiltransferasas de proteínas en hongos.

| Organismo | Proteínas PMT | Funciones | Referencias |
|----------------------|--|--|--|
| <i>S. cerevisiae</i> | Pmt1p, Pmt2p, Pmt3p, Pmt4p, Pmt5p, Pmt6p | Crecimiento e integridad de la pared celular. | Lussier <i>et al</i> , 1995; Gentzsch y Tanner, 1996; Strahl y Bolsinger, 1999 |
| <i>C. albicans</i> | Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p, Pmt5p, Pmt6p | Crecimiento, morfogénesis, integridad de pared celular, sensibilidad antifúngica, adherencia y virulencia. | Timpel <i>et al</i> , 1998; Timpel <i>et al</i> , 2000; Prill <i>et al</i> , 2005; Rohuabhia <i>et al</i> , 2005 |
| <i>S. pombe</i> | Oma1p, Oma2p, Oma4p | Crecimiento, morfogénesis integridad de la pared celular | Willer <i>et al</i> , 2005; Tanaka <i>et al</i> , 2005 |
| <i>C. neoformans</i> | Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p | Morfogénesis, integridad de pared celular, sensibilidad a estrés osmótico, virulencia | Olson <i>et al</i> , 2007; Willger <i>et al</i> , 2009 |
| <i>A. fumigatus</i> | Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p | Crecimiento, morfogénesis, integridad de pared celular, sensibilidad a equinocandina y no participan en virulencia | Mouyna <i>et al</i> , 2010; Fang <i>et al</i> , 2010; Zhou, <i>et al</i> , 2007. |
| <i>A. nidulans</i> | PmtBp, PmtAp, PmtCp | Crecimiento, morfogénesis (esporulación), integridad de pared celular y sensibilidad a compuestos antifúngicos | Shaw <i>et al</i> , 2002; Oka <i>et al</i> , 2004; Goto <i>et al</i> , 2009; Kriangkriipipat <i>et al</i> , 2009 |
| <i>U. maydis</i> | Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p | Sensibilidad a compuestos antifúngicos, formación de apesorios y patogénesis | Fernández-Álvarez <i>et al</i> , 2009 |

la identificación y caracterización de los genes *PMT* en el hongo patógeno postcosecha *P. digitatum*.

Los defectos fenotípicos caracterizados en los mutantes *PMT* de hongos se han relacionado con una deficiente glicosilación de proteínas dianas que pueden estar participando directamente en los procesos implicados (estructura de la pared celular) o bien indirectamente actuando como moléculas sensoras de rutas de señalización necesarias para la regulación intracelular de dichos procesos. En *S. cerevisiae* se comprobó que el complejo Pmt1p-Pmt2p participa en la

O-glicosilación específica de proteínas relacionadas con la pared celular como Kre9p, Cts1p y Pir2p (Gentzsch y Tanner, 1997), mientras que Axl2p, Gas1p y Fus1p son glicosiladas por Pmt4p (Gentzsch y Tanner, 1997; Sanders *et al.*, 1999; Proszynski *et al.*, 2004). Además, las proteínas localizadas a nivel de membrana como Wsc1p, Wsc2p, Mid2p, Msb2p son potencialmente O-glicosiladas por miembros de la familia *PMT* y actúan como osmosensores (Philip y Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004; Proszynski *et al.*, 2004; Hutzler *et al.*, 2007).

En estudios previos también se han descrito varias proteínas que son glicosiladas por la familia *PMT* en *C. albicans* (Kapteyn *et al.*, 1999; Kapteyn *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005; Cantero *et al.*, 2007), *U. maydis* (Lanver *et al.*, 2010; Fernández-Álvarez *et al.*, 2012) y *A. nidulans* (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009; Futagami *et al.*, 2011), y cuya glicosilación defectuosa influyó negativamente en la integridad de pared celular, morfogénesis, sensibilidad a compuestos antifúngicos e interacción de hongo patógeno con el huésped. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína osmosensora Msb2p protege a las células de *C. albicans* frente a la toxicidad de péptidos antimicrobianos (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Además se ha encontrado que Msb2p es O-glicosilada por Pmt4p en *U. maydis* y participa en la formación de los apresorios necesarios para la completa virulencia de este hongo biótrofo (Lanver *et al.*, 2010; Fernández-Álvarez *et al.*, 2012).

Como se ha descrito en esta Introducción, la glicosilación de proteínas se ha relacionado con la virulencia de hongos patógenos y además, determina la sensibilidad de levaduras frente al péptido modelo PAF26. Esta tesis doctoral está centrada en la identificación y caracterización funcional de genes *PMT* en el hongo patógeno postcosecha de frutos cítricos *P. digitatum*. También se ha usado *S. cerevisiae* para caracterizar su interacción con PAF26, y la importancia de la pared celular y la glicosilación de proteínas en el modo de acción del péptido. Este trabajo demuestra la importancia del gen *PdigPMT2* en el crecimiento, esporulación, sensibilidad a compuestos antifúngicos incluyendo a PAF26 y en la virulencia de *P. digitatum*.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca en el estudio del mecanismo de acción antifúngico del péptido PAF26 y de la participación de la glicosilación de proteínas en dicho mecanismo. Se ha profundizado en el análisis de la implicación de la pared celular y de genes de glicosilación de proteínas como determinantes de la sensibilidad de *S. cerevisiae* a PAF26, y se han identificado y caracterizado funcionalmente los genes de las manosiltransferasas de proteínas (*PMT*) en el hongo patógeno postcosecha de frutos cítricos *Penicillium digitatum*. Se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Caracterización de la interacción del péptido antifúngico PAF26 sobre la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2.** Identificación de la familia de genes *PMT* en el hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum* y caracterización de su expresión génica.
- 3.** Caracterización funcional de los genes *PMT* en *P. digitatum* mediante disrupción génica y expresión constitutiva a través de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A microscopic image showing several long, thin, filamentous cyanobacteria. The filaments are composed of individual cells, some of which are slightly larger and more rounded than others, possibly representing heterocysts. The filaments are arranged in a somewhat vertical, branching pattern. The background is a light, uniform color.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Microorganismos y plásmidos

En la **Tabla 4** se indican las principales cepas de bacterias, levaduras y del

Tabla 4. Listado de microorganismos utilizados en este trabajo.

| Especie | Cepa | Características |
|-----------------------|-------------------|--|
| <i>E. coli</i> | JM109 | e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15] |
| <i>A. tumefaciens</i> | AGL1 | (Lazo <i>et al.</i> , 1991) |
| <i>S.cerevisiae</i> | BY4741 | Cepa parental (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 uraΔ0) ^a |
| | Δ <i>ipt1</i> | BY4741a <i>ipt1</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>arg1</i> | BY4741a <i>arg1</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>ecm33</i> | BY4741a <i>ecm33</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>eos1</i> | BY4741a <i>eos1</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt1</i> | BY4741a <i>pmt1</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt2</i> | BY4741a <i>pmt2</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt3</i> | BY4741a <i>pmt3</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt4</i> | BY4741a <i>pmt4</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt5</i> | BY4741a <i>pmt5</i> Δ::KanMX4 |
| | Δ <i>pmt6</i> | BY4741a <i>pmt6</i> Δ::KanMX4 |
| <i>P. digitatum</i> | PHI26 (CECT20796) | Cepa silvestre altamente virulenta (López-García <i>et al.</i> , 2002) |
| | PDEH515 | Transformante Δ <i>pmt2</i> con disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> |
| | PDEH540 | Transformante ectópico del casete de disrupción del gen <i>PdigPMT2</i> |
| | PDEH58 | Transformante del gen <i>PdigPMT2</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH59 | Transformante del gen <i>PdigPMT2</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH67 | Transformante del gen <i>PdigPMT2</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH8 | Transformante del gen <i>PdigPMT1</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH9 | Transformante del gen <i>PdigPMT1</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH143 | Transformante del gen <i>PdigPMT4</i> con expresión constitutiva |
| | PDEH144 | Transformante del gen <i>PdigPMT4</i> con expresión constitutiva |

a. <http://web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>

hongo *P. digitatum* utilizadas en este trabajo. Los plásmidos generados durante esta tesis se enumeran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Plásmidos obtenidos en esta tesis.

| Plásmido | Descripción |
|---|--|
| pGEM-T_pmt1_EH43 pGEM-T_pmt2_EH2 pGEM-T_pmt4_EH39 | Fragmentos parciales de los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> clonados en pGEM-T |
| pGEM-T_PdigPMT1_GOI pGEM-T_PdigPMT2_GOI pGEM-T_PdigPMT4_GOI | Genes completos <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> PHI26 clonados en pGEM-T |
| pGEM-T_PdigPMT1_CDS pGEM-T_PdigPMT2_CDS pGEM-T_PdigPMT4_CDS | Secuencias codificantes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> PHI26 clonados en pGEM-T |
| pGREG505_PdigPMT1 pGREG505_PdigPMT2 pGREG505_PdigPMT4 | Secuencias codificantes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> PHI26 clonados en pGREG505 |
| pGEM-T_Hyg | Casete de higromicina derivado de pBht2 clonado en pGEM-T |
| pGEM-T_pmt1_Hyg pGEM-T_pmt2_Hyg pGEM-T_pmt4_Hyg | Casete de disrupción para los genes <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> PHI26 clonado en pGEM-T |
| pGEM-T_PgpdA | Promotor <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> derivado de pTAS5 clonado en pGEM-T |
| pBht2_PgpdA | Promotor <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> clonado con <i>Pst</i> I/ <i>Sma</i> I en pBht2 |
| pBht2_pmt1 pBht2_pmt2 pBht2_pmt4 | <i>PdigPMT</i> clonados en pBht2_PgpdA para expresión constitutiva |
| pGKO2_pmt1 | <i>PdigPMT1</i> interrumpido por el casete Hyg clonado con <i>Hind</i> III/ <i>Sa</i> I en pGKO2 |
| pGKO2_pmt2 | <i>PdigPMT2</i> interrumpido por el casete de Hyg clonado con <i>Xba</i> I/ <i>Sa</i> I en pGKO2 |
| pGKO2_pmt4 | <i>PdigPMT4</i> interrumpido por el casete de Hyg clonado con <i>Hind</i> III/ <i>Spe</i> I en pGKO2 |

2. Medios de crecimiento y condiciones de cultivo

2.1. Bacterias

La cepa bacteriana JM109 de *E. coli* se creció en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) a 37 °C. La cepa AGL1 de *A. tumefaciens* se creció en medio LB conteniendo el antibiótico rifampicina (20 µg/mL) a 28 °C.

2.2. Levaduras

Las cepas de levadura empleadas en este trabajo se crecieron a una temperatura de 30 °C en medio YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de dextrosa, más 1,5 % agar bacteriológico en el caso de placas de medio sólido). Para la preparación de los pre-inóculos, las cepas de levadura se crecieron toda la noche a 30 °C en agitación 200 rpm en medio líquido YPD. Al día siguiente los cultivos nocturnos se refrescaron a una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,2 y se crecieron a 30 °C durante 3 h hasta alcanzar la fase exponencial (DO₆₀₀ ~ 0,5). Seguidamente, se cuantificó el número de células/mL con una cámara cuenta glóbulos (Neubauer improved, Brand, Germany) y se ajustó a la concentración apropiada para cada ensayo.

2.3. *P. digitatum*

La cepa silvestre PHI26 de *P. digitatum* utilizada en esta tesis se creció en placas de medio sólido PDA (agar patata dextrosa, Difco), a la temperatura óptima de 24 °C durante 7-10 días. Generalmente, luego de 7 días de incubación (hasta 12 días en el caso de los transformantes con dificultades de crecimiento) se recogieron los conidios rascando las placas esporuladas con asas estériles y resuspendiéndolos en agua estéril. Luego se filtraron con velo de novia y se diluyeron para su recuento en cámara cuenta glóbulos (Neubauer improved) para ajustar a la concentración deseada en cada experimento.

Para la extracción de RNA, una suspensión de $2,5 \times 10^4$ conidios/mL se inoculó en el centro de membranas de nitrocelulosa depositadas sobre placas PDA. Las placas se incubaron a 24 °C durante 2, 4 y 7 días, el micelio crecido se recuperó, secó y congeló a -80 °C hasta la extracción de RNA. En determinados

experimentos, el hongo se creció en placas de medio PDA conteniendo sorbitol (1,2 M) o peróxido de hidrógeno (1 mM) y se recuperó a los 3 días de incubación a 24 °C.

En el caso del crecimiento del hongo en medio líquido se usó medio PDB (caldo patata dextrosa, Difco). Para la extracción de RNA, se inocularon 100 mL de medio líquido diluido 1/5 (PDB al 20 %) con 5×10^5 conidios/mL del hongo y se incubaron a 24 °C en agitación 200 rpm durante 1, 2, 3 y 6 días. El micelio fue recuperado, filtrado, secado y congelado a -80 °C.

3. Péptidos sintéticos

Los péptidos utilizados en ese estudio (**Tabla 6**) fueron sintetizados por la compañía GenScript Corporation (Piscataway, EEUU) a una pureza de >95 %, siguiendo la metodología de síntesis múltiple de péptidos en fase sólida mediante la química del grupo base-lábil N-(9-fluorenil)-metoxicarbonilo (Fmoc) (Fields y Noble, 1990). La identidad de los péptidos se confirmó por espectrometría de masas y su pureza por cromatografía HPLC. En el caso de los péptidos PAF26, PAF95 y PAF96 también fueron sintetizados con su extremo amino terminal modificado por la adición covalente del fluoróforo tetrametilrodamina (TMR).

Las soluciones stock de cada péptido se prepararon a 1-5 mM en tampón 10 mM 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfónico (MOPS) a pH 7 y se mantuvieron

Tabla 6. Secuencias y propiedades de los péptidos usados en este estudio.

| Péptido | Secuencia | Carga | MW | Fuente |
|-------------|--|-------|------|--------|
| PAF26 | RKKWFW | 3 | 950 | a |
| PAF95 | AAAWFW | 0 | 751 | b |
| PAF96 | RKKAAA | 3 | 644 | b |
| P113 | AKRHHGYKRKFH | nd | nd | c |
| Melitina | GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂ | 5 | 2847 | d |
| Cecropina A | KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂ | 7 | 3933 | e |

Los residuos de aminoácidos catiónicos Arg y Lys aparecen en rojo, los aromáticos Trp y Phe en verde, los alifáticos Leu, Ile y Val en azul. Referencias: a. (López-García *et al.*, 2002); b. (Muñoz *et al.*, 2013b); c. (Jang *et al.*, 2008); d. (Terwillinger y Eisenberg, 1982); e. (De Lucca *et al.*, 1997).

a -20 °C. Las concentraciones de los péptidos se determinaron por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm ($\epsilon^{280} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el aminoácido triptófano y de $1200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el residuo tirosina) y confirmándose antes de cada experimento. En el caso de los péptidos TMR-PAF26, TMR-PAF95 y TMR-PAF96, la concentración también se determinó por espectrofotometría mediante la medida de la absorbancia a 555 nm ($\epsilon^{555} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del fluoróforo TMR). Las soluciones stock de cada péptido se prepararon en tampón MOPS a pH 7 y se mantuvieron a -20 °C protegidas de la luz.

4. Ensayos de sensibilidad frente a compuestos antifúngicos

4.1. *S. cerevisiae*

Se aplicaron 5 μL de diluciones seriadas (1/5) desde 1×10^7 UFC/mL de cultivos crecidos en fase exponencial sobre placas de medio sólido YPD conteniendo 0,03 % de dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich) ó 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de blanco de calcofluor (CFW) (Fluorescent Brightener 28, Sigma Aldrich). Las placas se incubaron a 30 °C durante 2 días.

4.2. *P. digitatum*

Se depositaron 5 μL de diluciones seriadas (1/10) desde una suspensión de 1×10^5 conidios/mL de los hongos sobre placas de medio sólido PDA, conteniendo 100 ó 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CFW; 200 ó 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SDS; 100 ó 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rojo Congo (CR) (Sigma Aldrich). Para el análisis de sensibilidad frente al estrés oxidativo se sembraron suspensiones de conidios en el centro de placas PDA, conteniendo 1, 2 ó 3 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sigma Aldrich). Las placas se incubaron a 24 °C durante 3 días.

5. Ensayos de actividad antimicrobiana y microbicida de péptidos sintéticos

5.1. *S. cerevisiae*

Para la realización de los ensayos de actividad fungicida frente a levaduras se siguió la metodología descrita previamente (López-García *et al.*, 2010a). Las células de levadura (1×10^7 células/mL) preparadas en YPD 20 % se incubaron con los péptidos PAF26, PAF95 o PAF96 a concentraciones MIC de $64 \mu\text{M}$, o con melitina a $32 \mu\text{M}$. Luego de 24 h de incubación a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, las células tratadas se diluyeron (1/5) y se depositaron en forma de gotas de $5 \mu\text{L}$ de las diluciones seriadas sobre placas de YPD libres de péptido. Las placas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 días.

En otro tipo de experimento realizado para obtener las curvas dosis-respuesta de los distintos péptidos PAF26, cecropina A, melitina y P113 frente a cepas de levadura, se trataron suspensiones de 1×10^4 células/mL (YPD 20 %) con distintas concentraciones de cada péptido entre 4 y $256 \mu\text{M}$. Luego de incubarlos 24 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se prepararon diluciones seriadas (1/5) de cada tratamiento y se sembraron $5 \mu\text{L}$ de cada dilución en placas YPD (sin péptido). Estas placas fueron incubadas durante 2 días a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente se realizó el recuento de las colonias microbianas. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

5.2. *P. digitatum*

Para llevar a cabo el ensayo de inhibición del crecimiento (o fungiestático) del péptido PAF26 frente a las cepas del hongo *P. digitatum* se siguió la metodología descrita previamente (López-García *et al.*, 2002). Se usaron placas estériles de microtítulo de 96 pocillos (Nunc) y se determinó la DO_{492} a diferentes tiempos de incubación, en un espectrofotómetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Electron). Como medio de crecimiento se usó medio PDB diluido al 5 % conteniendo 0,003 % (w/v) de cloranfenicol. Se trataron 5×10^5 conidios/mL de cada cepa fúngica con distintas concentraciones crecientes del péptido (0,25 a $16 \mu\text{M}$). Las placas de microtítulo se incubaron a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Se prepararon tres réplicas para cada concentración de péptido y se calculó la DO media y la desviación

estándar (SD) para cada tratamiento. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de un péptido para un microorganismo dado se definió como la mínima concentración de péptido que no mostró crecimiento al final del experimento (después de 3 días de incubación), en ninguno de los experimentos que se realizaron con esa combinación de péptido-hongo.

Por otro lado, en los ensayos que se realizaron para evaluar la actividad fungicida del péptido PAF26, suspensiones de $2,5 \times 10^4$ conidios/mL de las distintas cepas fúngicas del hongo se incubaron con tres concentraciones del péptido (4, 16 y 32 μM) así como con un control (sin péptido). Este experimento se realizó en agua o sorbitol 1 M (Sigma Aldrich). Luego de 16 h de incubación a temperatura ambiente, se prepararon diluciones seriadas de los distintos tratamientos y se sembraron sobre placas de PDA. Estas placas se incubaron durante 4 días a 24 °C y posteriormente se hizo el recuento de colonias fúngicas viables.

6. Visualización microscópica

6.1. *S. cerevisiae*

La visualización microscópica de la interacción de los péptidos PAF26, PAF95 y PAF96 marcados fluorescentemente con TMR sobre la levadura *S. cerevisiae* se hizo mediante microscopía confocal láser en el *Fungal Cell Biology Institute* (Universidad de Edimburgo, Reino Unido). Se utilizó un sistema confocal láser (BioRad Scannig System Radiance 2100) equipado con tres líneas de láser (Ar, HeNe y Red Diode), sobre un microscopio invertido modelo NIKON Eclipse TE2000-U, con platina motorizada. La fluorescencia de los péptidos marcados con TMR y el yoduro de propidio (PI, Sigma Aldrich) se detectaron con el filtro RFP que tiene una longitud de onda de excitación de 543 nm y emisión de 580-700 nm. Por otro lado, para la detección del marcador vacuolar cDFFDA (Oregon Green 488 carboxylic acid, OR, USA) se usó una longitud de onda de 488 nm para la excitación y de 515-530 nm para la emisión de la fluorescencia. En general, se empleó un detector de luz transmitida para la toma de fotografías simultáneas en

campo claro con los objetivos 40x y 60x (inmersión). Esto se hizo utilizando el programa Lasersharp (v.5.1, BioRad) y posteriormente se procesaron con el programa ImageJ (v.1.44, MacBiophotonics).

6.1.1. Localización e interacción de los péptidos PAF26, PAF95 y PAF96 en células enteras

Se trataron suspensiones acuosas de 1×10^6 UFC/mL de las distintas cepas de *S. cerevisiae* (**Tabla 4**) con $2,5 \mu\text{M}$ de los péptidos marcados fluorescentemente (TMR-PAF26, TMR-PAF95, TMR-PAF96) y se incubaron durante 30-60 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Posteriormente, se montaron en cámaras de cultivo de 8 celdas (Nalge Nunc International, Rochester, NY) y se observaron inmediatamente bajo el microscopio confocal láser. En el caso de los ensayos realizados para comprobar la localización intracelular del péptido TMR-PAF26, se incubaron las células de levadura durante 30 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en agua con $20 \mu\text{M}$ de la sonda vacuolar (cDFFDA) y luego se les agregó el péptido marcado a la misma concentración y condiciones de incubación detalladas previamente.

6.1.2. Localización e interacción del péptido PAF26 en protoplastos

La obtención de protoplastos de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (Petit *et al.*, 1994), pero con algunas modificaciones. Se prepararon pre-inóculos nocturnos que se refrescaron a una DO_{600} de 0,2 en 5 mL de YPD e incubaron durante 3 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 200 rpm. Luego, se prepararon diluciones 1/100 de cada cultivo para el recuento y se calculó el volumen necesario para tener 1×10^8 células/mL. Se centrifugaron a $1150 \times g$, 5 min y se lavaron con $500 \mu\text{L}$ de agua (2 veces). Posteriormente, se les agregó $500 \mu\text{L}$ de solución de pre-tratamiento (sorbitol 1 M, EDTA 60 mM, ditiotreitil DTT 20 mM) y se incubaron durante 30 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Las células se centrifugaron a $1150 \times g$, 3 min y se lavaron con $500 \mu\text{L}$ de sorbitol 1 M. Luego se les agregó $500 \mu\text{L}$ de solución de protoplastos (sorbitol 1 M, EDTA 60 mM, citrato sódico 100 mM) conteniendo 2 mg/mL de solución enzimática (Glucanex, Sigma Aldrich). Se incubaron a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 min y los protoplastos obtenidos se sedimentaron por centrifugación ($1150 \times g$, 3 min), se lavaron dos veces con $500 \mu\text{L}$ de

sorbitol 1 M y finalmente se resuspendieron en 300 μ L de sorbitol. Estos protoplastos se trataron con 2,5 μ M del péptido TMR-PAF26 e incubaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz, durante 30-60 min, y se visualizaron por microscopía confocal láser.

Por otro lado, en los ensayos que se realizaron para evaluar la actividad fungicida por microscopía, las células enteras y los protoplastos de levadura fueron sometidos primero a un tratamiento con 2,5 μ M del péptido PAF26 sin marcar (**Tabla 6**) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad, y seguidamente se les incorporó 2 μ g/mL del marcador de muerte celular PI. Estas muestras se observaron por microscopía confocal láser (apartado 6.1.1).

6.2. *P. digitatum*

El blanco de calcofluor es un compuesto que se une a la quitina presente en las paredes celulares de los hongos permitiendo su detección y visualización por microscopía de fluorescencia (Pringle, 1991). La observación de la fluorescencia se hizo mediante un microscopio de epifluorescencia (E90i, Nikon) con contraste interferencial diferencial (DIC) para campo claro y la fluorescencia del CFW se detectó con los filtros de longitudes de onda de excitación/emisión de 395/440 nm, respectivamente. Las fotografías se tomaron generalmente con el objetivo 40x usando el programa NIS-Elements BR (v2.3, Nikon).

Para analizar la morfología de las cepas fúngicas por microscopía de fluorescencia se utilizó el procedimiento descrito por (Harris *et al.*, 1994). Se depositaron 100 μ L de una suspensión de 5×10^4 conidios/mL preparada en medio PDB en el centro de portaobjetos de vidrio. Luego de 24, 48, 72 h de incubación a 24 °C en ambiente saturado de humedad, se trataron con 100 μ L de una solución de fijación (formaldeído 3,7 %; tampón fosfato salino PBS 50 mM, pH 7; Triton X-100 0,2 %) durante 30-60 min, se escurrieron y agregaron 100 μ L de tampón PBS pH 7. Se trataron con una solución de CFW 0,1 % p/v a una concentración final de 50 μ g/mL, durante 10 min en oscuridad y lavaron con tampón PBS pH 7, se escurrieron los portaobjetos y luego se les agregó una solución de montaje (PBS diluido 1/10, glicerol 50 % v/v).

Por otro lado, para el análisis de la germinación de los conidios y el micelio envejecido de los hongos, se utilizaron cultivos sumergidos en 1 mL de medio PDB que se crecieron a 24 °C y 200 rpm, durante 16 h y 7 días, respectivamente. Estas muestras se trataron con CFW de la misma manera descrita previamente y luego se montaron sobre el portaobjetos para su visualización por microscopía de fluorescencia.

7. Ensayos de inoculación sobre frutos cítricos

Para evaluar la infección de *P. digitatum* sobre frutos cítricos, se realizaron bioensayos de inoculación controlada siguiendo el procedimiento frecuentemente usado en nuestro laboratorio (López-García *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2007a; Muñoz *et al.*, 2007b). En estos ensayos se hicieron heridas en la piel del fruto y se inoculó cada herida con una concentración determinada de conidios según las características del ensayo realizado. Los experimentos se llevaron a cabo sobre frutos recién cosechados de naranjas "Navelina" [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] que fueron suministrados por la Cooperativa Vinícola de Lliria (Lliria, Valencia). Los frutos se higienizaron mediante un baño de 5 min en 5 % de lejía comercial, posteriormente se lavaron con agua y se secaron a temperatura ambiente durante una noche. Se realizaron cuatro heridas en la región ecuatorial del fruto de unos 3 mm de profundidad con una punta de clavo estéril y se inocularon con 5 µL de 1×10^4 ó 1×10^6 conidios/mL del hongo dependiendo del ensayo. Para cada cepa fúngica se hicieron tres réplicas, de cinco frutos por réplica y cuatro heridas por fruto. En todos los ensayos se usaron como control frutos de naranjas con heridas e inoculados con agua estéril. Estas cajas de frutos inoculados se mantuvieron en condiciones apropiadas para el avance de la enfermedad en cámara a 20 °C y 90 % de humedad relativa.

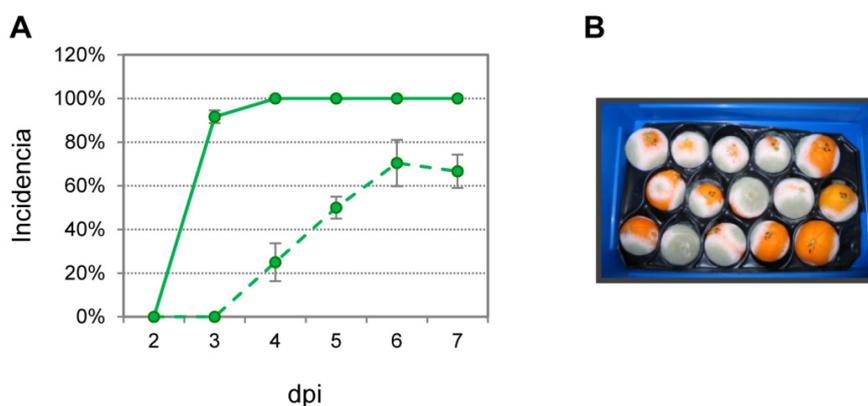


Figura 11. Evolución de la podredumbre verde causada por *P. digitatum* PHI26 sobre frutos cítricos.

A) Curvas del progreso de la infección fúngica con 1×10^6 conidios/mL (línea entera) y con 1×10^4 conidios/mL (línea a trazos) obtenidas con el porcentaje de heridas infectadas en cada día post-inoculación (dpi). B) Caja representativa de 15 frutos infectados con el hongo, a 24 °C y 90 % humedad relativa, registrándose la aparición y el número de heridas infectadas desde los 2 a 7 dpi.

El desarrollo de la infección se determinó diariamente a partir de los 2 días posteriores de inoculación (dpi) y hasta los 7 dpi, registrándose la incidencia de la podredumbre como porcentaje de heridas infectadas para cada una de las réplicas, calculándose la media y la desviación estándar entre las 3 réplicas realizadas (**Figura 11**). También, se observó la evolución del índice de esporulación sobre los frutos infectados.

Para la extracción de RNA, se recogieron muestras de tejido de naranjas infectadas a los 1, 2, 3, 4 y 7 dpi, con un sacabocados de 5 mm de diámetro alrededor del sitio de inoculación. Las muestras incluyen el flavedo de la piel (parte coloreada) y el albedo (parte blanca), evitando la pulpa del fruto. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se trituraron con un Molinillo A11, y almacenaron a -80 °C.

8. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

8.1. Extracción de DNA genómico de *P. digitatum*

La purificación de DNA se realizó a partir del micelio de un cultivo de *P. digitatum* (5×10^5 conidios/mL) crecido en 500 mL de PDB durante 4 días a 24 °C y 180 rpm, recogido por filtración con velo de novia y secado con papel de filtro. El micelio se congeló en nitrógeno líquido, trituró en un mortero de porcelana y almacenó a -80 °C hasta su utilización para la extracción de DNA y RNA. Para la extracción de DNA de buena calidad se siguió un protocolo descrito anteriormente (Moller *et al.*, 1992) con modificaciones. Un gramo de micelio fue homogeneizado en 10 mL del tampón de extracción TNES (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 2 % p/v, β -mercaptoetanol 1 % v/v, proteinasa K 100 μ g/mL). Se incubó durante una hora a 60 °C, con agitación moderada. Posteriormente, se añadieron 3,9 mL de NaCl 5 M y 1,4 mL de CTAB 10 %. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 10 min. A continuación se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 26900 xg durante 10 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa y se añadió 7,5 mL de acetato de amonio (NH_4OAc) 5 M. Se incubó en hielo durante 60 min, se centrifugó a 26900 xg , durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. El DNA se precipitó de la fase acuosa con 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 26900 xg durante 10 min. El precipitado se lavó con 70 % etanol, se dejó secar bien y finalmente se resuspendió en 490 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 2 mM pH 8,8) e incubó 1 h con 10 μ L de RNAsa A (20 mg/mL) (Sigma Aldrich) a 37 °C, para degradar el RNA. Seguidamente, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se añadió 500 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 15 min a 13200 xg . A continuación, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó 400 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se volvió a centrifugar y se recuperó la fase acuosa, a la que se añadieron 35 μ L de acetato sódico 3 M y 210 μ L de isopropanol (0,6 vol.) para precipitar el DNA. El DNA se recogió por centrifugación a 13200 xg , durante 5 min, se lavó con etanol al 70 % frío (-20 °C) y finalmente se resuspendió con 75 μ L de TE. El DNA se cuantificó por

espectrofotometría y analizó por electroforesis en gel de agarosa (apartados 10 y 11).

Para la verificación de los transformantes de *P. digitatum* por PCR y análisis Southern se utilizó un protocolo rápido de extracción de DNA (Khang *et al.*, 2007). Las cepas transformantes se cultivaron en tubos de 2 mL conteniendo 1 mL de PDB durante 4 días a 24 °C en agitación 200 rpm. El micelio se recolectó por centrifugación a 13200 $\times g$, 10 min a 4 °C, y congeló en N₂ líquido. Luego, se agregaron 600 μ L de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 100 mM pH 8; SDS 0,5 % p/v; acetato sódico 300 mM) y 0,5 μ L proteinasa K (10 μ g/mL). A continuación, se trituró manualmente el micelio con ayuda de un micro vástago de tubos eppendorf (Sigma Aldrich) y luego de incubarlos 1 h a 65 °C, se añadió 600 μ L fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) agitando vigorosamente. Se centrifugó a 13200 $\times g$, 10 min a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo con 0,7 volúmenes de isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó a 13200 $\times g$, 10 min, se dejó secar bien y finalmente se resuspendió en 35 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 2 mM pH 8) e incubó a 37 °C, 30-60 min con 0,5 μ L RNasa A (20 mg/mL). Generalmente se utilizó 0,5 a 1 μ L del DNA genómico para las reacciones de PCR.

8.2. Extracción de RNA total de *P. digitatum*

Para la extracción de RNA del micelio del hongo crecido *in vitro*, se siguió el siguiente protocolo. A 1 g de micelio congelado se añadió 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; LiCl 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,8; SDS 1 % p/v; polivinil pirrolidona 40 PVP-40 1 % p/v; β -mercaptoetanol 1 % v/v) con 5 mL de fenol equilibrado con Tris-HCl, previamente calentados a 65 °C, 5 min. Se homogenizó con Polytron PT 45/80 (Kinematica AG) y luego de incubarlos a 65 °C durante 15 min, se añadió 5 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 20 min a 4000 $\times g$ a 4 °C y el sobrenadante (\sim 10 mL) fue reextraído con 10 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Luego, se recuperó la fase acuosa superior centrifugando a 4 °C durante 20 min a 4000 $\times g$. Se agregó 0,33 volúmenes de LiCl 12 M y después de incubarlo 3 h a -20 °C, se centrifugó a

26900 xg durante 1 h. El pellet resultante se lavó con 700 μL de etanol al 70 % (v/v) frío y se centrifugó a 13200 xg durante 15 min a temperatura ambiente (2 veces). El precipitado se lavó con 250 μL de acetato sódico 3 M pH 6,0 (2 veces) y centrifugó a 13200 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se realizó un lavado del pellet con etanol 70 % (v/v) frío y se centrifugó a temperatura ambiente a 13200 xg , 5 min. El pellet resultante se resuspendió en 50 μL de agua mili-Q estéril. El contenido en RNA se cuantificó por espectrofotometría (apartado 10) y su integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa previa desnaturalización por calor (apartado 11).

Para extraer el RNA total de muestras de tejido de naranja infectada con el hongo, se siguió el protocolo descrito previamente (Rodrigo *et al.*, 2004). Dos gramos de tejido de naranja infectado se mezclaron con 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, NaCl 400 mM, EDTA 50 mM pH 8,8, sarkosyl 2 % p/v, polivinil pirrolidona 40 (PVP-40) 1 % p/v, β -mercaptoetanol 1 % v/v) y 5 mL de fenol equilibrado con Tris-HCl. Se incubó durante 15 min a 65 °C y luego se añadieron 5 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 20 min a 4000 xg a 4 °C y el sobrenadante (~ 10 mL) fue reextraído con 10 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Luego de centrifugar a 4 °C durante 20 min a 4000 xg se recuperó la fase superior y los ácidos nucleicos se precipitaron con 1,5 volúmenes de etanol 100 % frío. Inmediatamente se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 26900 xg , y el precipitado se lavó con 5 mL de etanol al 70 % (v/v). El sedimento se resuspendió en 7,5 mL de tampón TESa (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 5 mM; sarkosyl 0,1 % p/v) calentando a 65 °C durante 15 min. A continuación se añadieron 7,5 mL de agua mili-Q estéril, se mezcló, y se añadieron 5 mL de LiCl 12 M. Después de incubar toda la noche a -20 °C se centrifugó a 26900 xg durante 1 h. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70 % (v/v) frío y se centrifugó a 13200 xg , 5 min. Se lavó con 1 mL de acetato sódico 3 M (pH 6,0) y centrifugó a 13200 xg durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un lavado con etanol al 70 % (v/v) frío y se centrifugó a temperatura

ambiente a 13200 $\times g$, 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 μL de agua mili-Q estéril, y el RNA se comprobó cómo se ha indicado anteriormente.

8.3. Extracción y purificación de otros DNA

La purificación del DNA plasmídico de *E. coli* se realizó empleando el kit comercial "Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit" (Sigma Aldrich). Los productos amplificados por PCR y las muestras de DNA procedentes de reacciones de ligación o tratamientos con endonucleasas se purificaron siguiendo las instrucciones del kit "High Pure PCR product purification" (Roche). Se utilizó el kit "PrepEase Gel Extraction" (USB) para recuperar fragmentos de DNA de geles de agarosa. Para esto último, las bandas de DNA de interés fueron cortadas del gel minimizando el tiempo de exposición a la luz UV.

9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

9.1. PCR estándar

Las reacciones de amplificación de DNA por PCR generalmente se realizaron en un volumen final de reacción de 50 μL conteniendo 50-200 ng del DNA genómico ó 2 ng de DNA plasmídico, tampón de reacción 1x (Ecogen), 1,5 mM de MgCl_2 , solución de dNTPs (0,2 mM de cada nucleótido, Invitrogen), cada oligonucleótido (Invitrogen) a una concentración final de 0,2 μM (excepto en las PCR con cebadores degenerados que se utilizó a 0,1 μM), y 0,02 U/ μL de EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen). Las reacciones de amplificación del DNA por PCR se llevaron a cabo en dos termocicladores alternativos: un termociclador estándar (TC-3000, Techne) y uno de gradiente G-Storm (GS482, Gene Technologies). Los programas de amplificación se adaptaron a cada caso concreto, pero en general fueron: desnaturalización 3 min a 94 °C; 35 ciclos de tres etapas de 30 s a 94 °C, 45 s a la temperatura de hibridación (generalmente T_m de los oligonucleótidos usados menos 4-10 °C), y >1 min (este tiempo varió según el tamaño del fragmento deseado, siendo necesario 1 min para amplificar 1 kb) a 72 °C; elongación final de 5 min a 72 °C.

En determinados casos como la generación de construcciones para la transformación genética de *P. digitatum* (p. ej., PCR de fusión) o la complementación funcional en levaduras se empleó una DNA polimerasa termoestable de alta fidelidad de copia ("AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity", Invitrogen). Las reacciones se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante con 20 ng del DNA, el tampón de reacción 1x (AccuPrime PCR Buffer I, Invitrogen), 0,2 μM de cada oligonucleótido, 1 U de "AccuPrime™ Taq High Fidelity" (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron similares a las mencionadas previamente, pero utilizando 68 °C para la fase de extensión en la reacción de PCR que es la temperatura óptima de esta enzima.

9.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para determinar la expresión génica, en este trabajo se ha utilizado exclusivamente la transcripción reversa unida a PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Primero, el RNA purificado se trató con DNasa libre de RNasa (kit "DNA-free™" Ambion) para eliminar restos de DNA presentes en las muestras. Para la síntesis de cDNA, el RNA tratado se sometió a transcripción reversa usando 200 U de "SuperScript III reverse transcriptase" (Invitrogen), 0,5 μg de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen), 5 mM de DTT, 500 μM de cada dNTP y 20 U de inhibidor de RNasa (Roche Diagnostics) en un volumen final de 20 μL. La reacción se incubó a 50 °C durante 1h 30 min y a continuación se diluyeron las muestras de cDNA a las concentraciones adecuadas para la qRT-PCR cuantitativa.

Para el diseño de los oligonucleótidos cebadores específicos se utilizaron los programas informáticos DNAMAN (versión 4.03, Lynnon BioSoft) y Primer3Plus (<http://biotools.umassmed.edu>). Se consideraron los parámetros de 18-23 pb de longitud, amplicones de 100-200 pb, 50 % de G+C y temperatura de hibridación próxima a 63 °C. Se comprobó que no formaran dímeros con el programa Gene Runner (Versión 3.05). Las secuencias de los oligonucleótidos específicos diseñados se muestran en la **Tabla 7**. Estos mismos oligonucleótidos diseñados para los genes *PMT* fueron utilizados para la búsqueda de los fósquidos individuales dentro de la biblioteca genómica de *P. digitatum* (apartado 2.3 de Resultados).

La qRT-PCR se realizó en un termociclador "LightCycler 480 Real-Time PCR System" (Roche Diagnostics) y se utilizó el programa "LightCycler 480 SW 1.5" (Roche Diagnostics) para el registro de los datos del ciclo umbral (Ct, "threshold cycle") de cada transcrito. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, usando las muestras diluidas de cDNA (en general 100 ng), ½ volumen de la mezcla de reacción ("master mix" del kit "LightCycler 480 SYBR Green I", Roche), y 0,3 µM de cada par de cebadores específicos en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min (desnaturalización); 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, luego 10 s a la temperatura de hibridación (Thib) para cada pareja de oligonucleótidos específicos (**Tabla 7**), y 72 °C durante 10 s; 1 ciclo del programa para obtener la curva de desnaturalización. Cada muestra se sometió al programa curva de desnaturalización para determinar las T_m (temperatura media de desnaturalización) de cada amplicón, el cual consistió en: 95 °C durante 10 s; 15 s a Thib + 5 °C; calentar hasta 95 °C con una rampa de calentamiento de 0,1 °C/s; enfriar a 40 °C durante 30 s. El tamaño esperado de cada reacción de amplificación se comprobó mediante PCR estándar (apartado 9.1) y electroforesis en gel de agarosa (apartado 10).

La eficiencia (E) de cada pareja de oligonucleótidos en las reacciones de qRT-PCR se calculó mediante curvas estándar con diluciones seriadas (1/2) por triplicado de una mezcla de muestras de cDNA y representando el logaritmo en base 10 de cada cantidad de cDNA frente al valor Ct usando el programa "LightCycler 480 SW 1.5" (Roche Diagnostics). Se comprobó que las eficiencias obtenidas fueron próximas a 2 para los cebadores analizados.

Se utilizaron simultáneamente los genes de referencia de expresión teóricamente constitutiva de la β-Tubulina (Sanzani *et al.*, 2009), la proteína ribosomal L18 (Gandía *et al.*, 2012) y la subunidad pequeña ribosomal RNA18s (Nair *et al.*, 2009) (**Tabla 7**), validados mediante el programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/wjvdesomp/genorm/>) (Vandesompele *et al.*, 2002). La cuantificación relativa de las diferencias de expresión de los genes de interés normalizada frente a los genes de referencia en tratamientos múltiples se

determinó con el programa REST-MCS v2, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (gen de interés) - ΔCt (gen de referencia) (Pfaffl *et al.*, 2002). La significación estadística de los cambios de expresión génica se determinó mediante el programa REST 2009 (<http://www.genequantification.de/>). Para la cuantificación absoluta, se obtuvieron curvas de referencia a partir de la amplificación mediante qRT-PCR de una serie de diluciones (1/10) de cantidades equimolares (0,03 moles) para cada uno de los plásmidos que contenían fragmentos parciales de los distintos genes *PMT* (Tabla 5).

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos diseñados para qRT-PCR.

| Organismo | Nombre | Gen | Uso | Secuencia 5' - 3' | Thib (°C) |
|-----------------------|--------|-------------------|-----|--------------------------|-----------|
| <i>P. digitatum</i> | OJM115 | PMT1 | F | CTCTCGCCGTTGGAATCTATCTT | 63 |
| | OJM116 | PMT1 | R | CTTGAACGAAGCGTGCTTGTAAAT | 63 |
| | OJM91 | PMT2 | F | GTATGCCTGGCTTTGTTGACTG | 63 |
| | OJM92 | PMT2 | R | CTTCAGGTCGCCAAATTTATTC | 63 |
| | OJM93 | PMT4 | F | TGGACTTGAACAGAACAGGTA | 63 |
| | OJM94 | PMT4 | R | CATTGACTTGTGGAACCTCTTGG | 63 |
| | OJM151 | L18a | F | TGGGGCAGAGGGAACCTTGG | 65 |
| | OJM152 | L18a | R | ACCGACGCTGTTGAGGCTCT | 65 |
| <i>P. expansum</i> | OJM85 | β -Tubulina | F | AGCGGTGACAAGTACGTTCC | 65 |
| | OJM86 | β -Tubulina | R | ACCCTTGGCCAGTTGTTAC | 65 |
| <i>P. chrysogenum</i> | OJM334 | rRNA 18S | F | CGACTTCAGGAAGGGGTGTA | 56 |
| | OJM335 | rRNA 18S | R | CTTGGATGTGTTAGCCGTT | 56 |

10. Reacciones de modificación y manipulación de ácidos nucleicos

La concentración y calidad de las muestras de ácidos nucleicos (DNA y RNA) se determinaron espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Las reacciones de digestión con endonucleasas de restricción (Fermentas, Roche o Invitrogen) se realizaron en un volumen final de 20-25 μ L, según las instrucciones del proveedor. Finalmente, se hizo una inactivación térmica de las endonucleasas (10 min a 80 °C).

La ligación entre fragmentos de DNA con extremos cohesivos o romos se realizó con el enzima T4 DNA ligasa utilizando los kits comerciales "pGEM-T Easy" (Promega) para la clonación directa de productos de PCR (previa purificación por

columna, ver apartado 8.3) y "Rapid DNA ligation Kit" (Roche) para el resto de ligaciones. En algunos casos, y para disminuir la frecuencia de obtención de plásmidos sin inserto se procedió previamente a desfosforilar los plásmidos linearizados, usando la enzima fosfatasa alcalina del kit "Rapid DNA Dephos and Ligation" (Roche). Por otro lado, también previo a determinadas reacciones de ligación se empleó la enzima Klenow polimerasa (Amersham) para el relleno de extremos cohesivos.

11. Electroforesis de DNA

Para separar los fragmentos de DNA se utilizó la electroforesis en geles de agarosa (desde el 0,8 al 2,0 %, aunque lo usual fue el 1,0 %), en tampón de electroforesis TAE 1x (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8,0) conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio, a 80-100 V durante 45-90 min (Sambrook *et al.*, 1989). Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se sacaron fotografías a través de una cámara acoplada.

12. Construcción de la biblioteca genómica de *P. digitatum*

La construcción de la biblioteca genómica de la cepa PHI26 de *P. digitatum* se hizo sobre el fósido vector pCC2FOS con el kit comercial "CopyControl™ Fosmid Library Production" (Epicentre Biotechnologies) siguiendo básicamente las instrucciones del kit y que se resumen continuación. Este es un método eficiente para generar una biblioteca genómica con insertos de aproximadamente 40 kb, clonados en un vector tipo fósido que contiene un origen de replicación de copia única (que permite la estabilidad del fósido dentro del clon de *E. coli* pese a su gran tamaño) y otro origen de replicación inducible y multicopia (que facilita la obtención de grandes cantidades de DNA). Este vector de tipo fósido se empaqueta en extractos derivados del fago lambda e infecta sobre una cepa específica de *E. coli* EPI300-T1 que permite su conservación y amplificación.

12.1. Reparación del DNA

Después de distintos intentos, se decidió finalmente no fragmentar el DNA, sino usarlo directamente tal cual se obtenía por el procedimiento de purificación anteriormente descrito porque se encontró que ya estaba en fragmentos de un tamaño óptimo para el clonaje en el fósido. El DNA genómico (25 µg) (apartado 8.1), se sometió a un tratamiento enzimático para generar extremos romos (5´ fosforilados) con 1/20 volúmenes de la "End repair Enzyme Mix" provista por el kit, 1 mM ATP, 250 µM de la solución de dNTPs y 1x del tampón "End repair" en un volumen de 80 µL. Esta reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 min y la enzima se inactivó con choque térmico a 70 °C durante 10 min.

12.2. Purificación de fragmentos de DNA genómico

La separación del DNA para la selección de fragmentos se realizó mediante una electroforesis en Campo Pulsante (CHEF del inglés "Contour clamped homogeneous electric field") en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Ecogen) preparados en el tampón de electroforesis (TBE 0,5x). Las condiciones usadas para la electroforesis en campo pulsante fueron: 6 V/cm (voltaje), 14-40 s (pulso), 120 ° (ángulo), 14 °C (temperatura) y 16 h (tiempo).

Las bandas de DNA (40 kb) se recortaron del gel teñido en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 20 min y expuesto a luz UV. El DNA se purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial (Epicentre) incubando la banda a 70 °C durante 10 min en baño, añadiendo tampón "Buffer Gelase" y 1 U de "Enzyme Gelase" por cada 100 mg de agarosa, e incubando a 45 °C durante 3 h en baño. La enzima se inactivó a 70 °C durante 10 min y luego se enfrió rápidamente en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 11500 *xg* durante 20 min y se recuperó la fase acuosa.

El DNA se precipitó con 1/10 vol. de acetato sódico 3 M y 2,5 vol. de etanol, se lavó con 500 µL de etanol 70 % (dos veces), se secó y se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM). En este caso, la cuantificación del DNA obtenido se realizó mediante el uso del kit "Quant-iT™ PicoGreen dsDNA"

(Invitrogen) midiendo la intensidad de fluorescencia emitida a 520 nm en un espectrofluorómetro.

12.3. Reacción de ligación y empaquetamiento del fósrido

La ligación se hizo siguiendo las instrucciones del kit con algunas modificaciones. Se prepararon las reacciones de ligación con dos cantidades de DNA genómico (250 y 480 ng), 0,5 µg del vector pCC2FOS, 1 mM de ATP, 1x del tampón "Fast ligation" y 1/10 vol. de la ligasa "Fast Link DNA ligase" en un volumen final de 10 µL, e incubando 5 h a temperatura ambiente seguidas de inactivación a 70 °C durante 10 min.

Para el empaquetamiento de los fósridos resultantes, se agregaron 25 µL de "MaxPlax Lambda Packaging Extracts" a las reacciones de ligación y se incubó a 30 °C durante 90 min. Se repitió este paso una vez más, y luego se añadieron 200 µL de "Phage Dilution Buffer" (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM) y 5 µL de cloroformo. Esta mezcla se guardó a 4 °C hasta su utilización.

12.4. Infección y titulación de los fósridos sobre *E. coli* EPI300-T1

La cepa *E. coli* EPI300-T1 se creció a 37 °C en una placa de medio LB. El día previo al paso de empaquetamiento con el fago lambda, se realizó un pre-cultivo nocturno en medio LB conteniendo SO₄Mg 10 mM. Este pre-cultivo se refrescó en LB con SO₄Mg 10 mM hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0,8.

Para conocer la cantidad de fósridos empaquetados obtenidos, se hicieron diluciones seriadas (1/10) de la solución resultante del empaquetamiento; se infectaron las células de EPI300-T1 a DO₆₀₀ 0,8; se sembraron en placas de medio LB + cloranfenicol 12,5 µg/mL e incubaron a 37 °C. Se hizo el recuento de las colonias crecidas y se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución} \times 1000 \mu\text{L/mL}}{\text{Fagos plaqueados} (\mu\text{L})}$$

Por otro lado, también se determinó el número de fósmidos necesarios para cubrir completamente el tamaño del genoma de *P. digitatum* usando la fórmula:

$$N \text{ (Número de fósmidos)} = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$$

Siendo P: probabilidad deseada (99 %) y f: proporción del genoma contenido en un solo clon.

Una vez conocidos el número N y la titulación de los fósmidos empaquetados, se procedió a infectar de nuevo las células EPI300-T1 con la cantidad calculada de fósmidos empaquetados para obtener las UFC deseadas por placa de LB + cloranfenicol. Al día siguiente, las colonias crecidas se recogieron con medio líquido LB + glicerol 20 % (v/v) y la biblioteca genómica se guardó a -80 °C.

12.5. Inducción de los clones Copy Control Fosmid

Las mezclas de clones de fósmidos glicerizados o los clones individuales se crecieron en 5 mL de medio LB + cloranfenicol 12,5 µg/mL toda la noche a 37 °C, 200 rpm. Los pre-cultivos se refrescaron e indujeron a múltiples copias de fósido por célula durante 5 h a 37 °C, 200 rpm con la solución "CopyControl™ Induction Solution" provista por el kit. El DNA de los fósidos se purificó usando el kit "GenElute Plasmid Miniprep" (Sigma-Aldrich) y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis por PCR.

13. Paseo cromosómico para obtener secuencias completas de genes *PMT* de *P. digitatum*

Para identificar fósidos individuales portadores de cada gen *PMT* se hicieron tres ciclos sucesivos de amplificación por PCR usando como molde el DNA purificado de las mezclas de fósidos de la biblioteca genómica de *P. digitatum* (ver también **Figura 34**, apartado 2.2 de Resultados). Se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos específicos diseñados en el apartado 9.2 (**Tabla 7**) y como molde diluciones 1/10 de DNA de mezclas de fósidos.

Una vez identificados los fósidos positivos, se usó la estrategia de paseo cromosómico para obtener la longitud completa de cada gen *PMT*. Para ello, se hicieron entre 3 y 5 rondas consecutivas de secuenciación mediante el diseño de nuevos oligonucleótidos complementarios a las regiones flanqueantes de las secuencias de 1 kb obtenidas con cada reacción (**Tabla 8**). Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Secuenciación (SCSIE, Universitat de València, <http://scsie.uv.es/>). La unión de las secuencias obtenidas con cada oligonucleótido se realizó con el programa DNAMAN (Versión 4.03, Lynnon BioSoft) y se repitió hasta obtener las secuencias nucleotídicas completas del DNA en doble hebra de cada gen.

14. Hibridación y detección de ácidos nucleicos

El análisis por Southern se hizo usando el kit comercial "Digh High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II" (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante, salvo cuando se indique lo contrario. Este kit permite el marcaje de las sondas de DNA para la hibridación de forma no radioactiva, utilizando

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para el paseo cromosómico de los fósidos individuales de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Fósido | Nombre | Uso | Secuencia 5' - 3' | Thib (°C) | Ronda |
|--------------------------|--------|-----|----------------------|-----------|-------|
| pFOSPdigPMT1 05.11.15 | OJM133 | F | GAGAATGCCACGACGTTCC | 64 | 2° |
| | OJM134 | R | GCCCTGCGTGTTCAGATGG | 62 | 2° |
| | OJM139 | F | CTGGTACTTGTAGACCTTGC | 60 | 3° |
| | OJM140 | R | CGAAGCAAATCCACCGAAGC | 62 | 3° |
| | OJM161 | F | GCTCGCCTAGTCGGTCTCC | 64 | 4° |
| | OJM162 | R | GAAGTGAACGCAGATGGACG | 62 | 4° |
| | OJM168 | F | GCGAACGACATAGCTTGC | 64 | 5° |
| pFOSPdigPMT2 27.13.42 | OJM135 | F | CCATCCGGTCCCTAGGCTGC | 64 | 2° |
| | OJM136 | R | AGGTCGGACTCGTGTTTGGC | 64 | 2° |
| | OJM141 | F | AACCGTTGCCACCTTTGCGC | 64 | 3° |
| pFOSPdigPMT4 06.09.02 | OJM137 | F | GACTGGCACCGACACAGGAG | 66 | 2° |
| | OJM138 | R | GCCACCGAGCCCTTCCAG | 62 | 2° |
| | OJM142 | F | CCAATGTTACCGGCTGTTCG | 62 | 3° |
| | OJM163 | R | GTGCCGTCATTCGAGTTCTC | 62 | 4° |
| | OJM169 | R | TGCTCCAGTGTATTACGC | 66 | 5° |

digoxigenina (DIG), un esteroide hapteno, y subsecuentemente se realiza la detección quimioluminiscente por un ensayo inmunoenzimático.

14.1. Marcaje de Sondas de DNA

Se generaron sondas de DNA marcadas con DIG empleando "DIG High prime labeling mix" del kit comercial. Para el caso de *PdigPMT2*, una cantidad de 1 µg del producto de PCR amplificado con OJM150 y OJM190 (**Tabla 11**) y purificado por columna se marcó con la mezcla de marcaje que contiene oligonucleótidos cebadores al azar y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, la reacción se detuvo con EDTA e inactivación por calor a 65 °C, 10 min.

14.2. Transferencia y fijación de DNA a membranas de nailon

En primer lugar, 10 µg de DNA fúngico se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,8 % TAE 1x, a un voltaje constante de 50 V durante 3 h. Este gel se procesó y transfirió por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (HybondTM-N+, Amersham Biosciences), según procedimientos habituales (Sambrook *et al.*, 1989). Tras la transferencia el DNA se fijó a la membrana mediante irradiación con luz UV (UV Crosslinker).

14.3. Hibridación

La membrana con el DNA fijado se prehibridó e hibridó (42 °C y 44 °C, respectivamente) con la solución de hibridación provista por el kit comercial (10 mL y 3,5 mL/100 cm², respectivamente, de "DIG Easy Hyb", Roche) y siguiendo sus instrucciones, en un horno de hibridación (Amersham). La sonda de DNA marcada con DIG (apartado 14.1) (25 ng/mL, DIG Easy Hyb, Roche) se desnaturalizó con un baño térmico a 68 °C durante 10 min y luego se enfrió rápidamente en hielo durante 5 min. La solución de prehibridación y la mezcla sonda marcada/solución de hibridación pueden ser reutilizadas guardándolas a -20 °C.

Tabla 9. Soluciones usadas para la hibridación por Southern.

| Soluciones | Composición |
|-----------------------------|--|
| Solución acida | HCl 0,25 M |
| Solución Desnaturalización | NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N |
| Solución Neutralización | NaCl 3 M, TrisHCl 0,5 M, pH 7,5 |
| SSC 20x | NaCl 3 M, NaCitrato 0,3 M |
| Tampón de hibridación | SSC 0,5x, SDS 0,02 % v/v 1 % de solución de bloqueo DIG Easy Hyg 0,1 % p/v (Roche), N-laurilsarcosina 0,1 % |
| Solución lavado 2x | SSC 2x; SDS 0,1 % v/v |
| Solución lavado 0,5x | SSC 0,5x; SDS 0,1 % v/v |
| Tampón de ácido maleico 10x | ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM |
| Tampón de lavado | 1x de tampón de ácido maleico, Tween-20 0,3 % v/v |
| Solución de bloqueo | 1% del reactivo de bloqueo de DIG Easy Hyb, (Roche) 10x de tampón de ácido maleico |
| Tampón de detección 10x | Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM pH 9,5 |

14.4. Lavados post-hibridación y detección quimioluminiscente

Tras la hibridación, la membrana se lavó dos veces con la solución de lavado SSC 2x, SDS 0,1 % durante 5 min a temperatura ambiente en agitación. Luego, se lavó con la solución de lavado SSC 0,5x, SDS 0,1 % precalentada a 60 °C durante 15 min a 60 °C. Posteriormente se enjuagó la membrana con 25 mL del mismo tampón de lavado durante 5 min a temperatura ambiente. El bloqueo, la incubación con el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina ("anti DIG-AP", 750 U/mL, Roche), los lavados y el equilibrado con tampón de detección se realizaron exactamente siguiendo las instrucciones del kit comercial (ver **Tabla 9**).

La detección se realizó colocando la membrana sobre film transparente y con 1 mL del sustrato "CSPD Ready-To-Use". Se cubrió por encima con papel film para distribuirlo homogéneamente e incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego, se colocó la membrana entre papel acetato, se incubó 10 min a 37 °C, y se realizó la detección por exposición de 10 a 20 min en un detector de quimioluminiscencia (LAS-1000plus, Fujifilm).

15. Transformación de bacterias

15.1. Obtención de células electrocompetentes de *E. coli*

Se utilizó el siguiente protocolo de obtención de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 basándonos en aquel usado en nuestro laboratorio con DH5 α , con algunas modificaciones. A partir de una colonia individual se preparó un pre-cultivo que se inoculó (2,5 mL) sobre 500 mL de LB, e incubó a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0,5). Luego de una incubación de 10 min sobre hielo, las células se sedimentaron por centrifugación a 4 °C (3555 xg , 10 min). Las células se resuspendieron y sedimentaron por centrifugación sucesivamente en 250 mL, 100 mL, 40 mL y 500 μ L de glicerol 10 % frío. Luego de mantenerlo en cámara refrigerada a 4 °C sobre hielo durante 1 hora, se repartieron alícuotas de 40 μ L que fue el volumen usado para cada reacción de transformación y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

15.2. Obtención de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

De forma análoga, también se optimizó un protocolo específico en base a otros descritos previamente (http://www.rasmusfrandsen.dk/electro_c_at.htm), (Utermark y Karlovsky, 2008). A partir de un cultivo fresco de la cepa de *A. tumefaciens* (AGL1) se inoculó una colonia individual en 10 mL de medio LB + rifampicina 20 μ g/mL e incubó a 28 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente, se inoculó 600 μ L del pre-cultivo en 300 mL de medio LB + rifampicina 20 μ g/mL e incubó a 28 °C, 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600} 0,5. Posteriormente, se enfrió el cultivo sobre hielo por 15 min y luego se centrifugó a 4000 xg durante 10 min a 4 °C. Las células se lavaron con 100 mL de agua estéril fría y se centrifugaron a 4000 xg por 10 min a 4 °C (2 veces). Luego se resuspendieron con 10 mL de glicerol 10 % v/v frío e incubaron durante 1 h. Se volvió a centrifugar a 3555 xg por 10 min a 4 °C. Finalmente se resuspendieron con 2 mL de glicerol 10 % frío, se repartieron alícuotas de 45 μ L y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

15.3. Transformación de células bacterianas por electroporación

Para transformar las células bacterianas se utilizó el electroporador (Gene Pulser X Cell™, BioRad) con las siguientes condiciones: 2500 V (voltaje), 25 μ F (trasmisancia) y 200 ohm (resistencia). Se mezclaron 40-45 μ L de células electrocompetentes con 1-4 μ L ó 10 ng de DNA exógeno (DNA plasmídico o producto de reacción de ligación) y se transfirieron a una cubeta de electroporación (2 mm). Se dio el pulso de electroporación y rápidamente las células se recuperaron con 960 μ L de medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2 mM, NaOH pH 7) precalentado a la temperatura óptima de crecimiento bacteriano. Esta suspensión se incubó con agitación (200 rpm) a 28 °C durante 4 h para la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* y a 37 °C durante 1 h para la cepa JM109 de *E. coli*, y se sembraron distintas diluciones en placas de medio LB con el antibiótico de selección adecuado. La selección de plásmidos recombinantes pGEM-T se realizó sobre placas LB con ampicilina (100 μ g/mL), X-Gal (80 μ g/mL) e IPTG (0,5 mM). En el caso de los vectores pGKO2 y pBht2 se sembraron sobre placas de medio LB + kanamicina 75-100 μ g/mL.

16. Transformación de levaduras

16.1. Transformación de levadura con acetato de litio

Se siguió el protocolo de transformación de levaduras con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992). Se inoculó 1 mL de un pre-cultivo nocturno de la cepa BY4741 en 50 mL de medio YPD e incubó a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar la fase exponencial (4 h). Las células se sedimentaron por centrifugación a 5752 xg , 5 min y temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con agua estéril y una en 1 mL de acetato de litio (100 mM) mediante centrifugación a 5752 xg , 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μ L de acetato de litio (100 mM) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Se repartieron alícuotas de 50 μL y se agregaron 10 μL del DNA exógeno (1 μL del plásmido pGREG505 linearizado con *SaI* y cantidades iguales de los productos amplificados por PCR) y 350 μL de la solución de transformación que contenía 240 μL de PEG-3350 50 % (p/v), 36 μL de acetato de litio 1 M, 50 μL de DNA de esperma de salmón (10 mg/ml) y 24 μL de agua estéril. La mezcla se incubó a 30 °C durante 30 min y luego a 42 °C en baño térmico durante 30 min. A continuación, las células se centrifugaron a 11500 $\times g$, 15 s, y se lavaron con 1 mL de agua estéril y centrifugación. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μL de medio YPD y se sembraron (100 μL) en placas de medio SC carente de leucina SC-Leu (base nitrogenada 0,6 %, glucosa 2 %, medio sintético-Leu 0,16 % Sigma-Aldrich, agar 2 %) para la selección de las colonias transformantes. Las placas se incubaron a 30 °C durante 2 días.

16.2. Purificación del DNA plasmídico de levaduras

La recuperación de los plásmidos recombinantes de las levaduras se hizo siguiendo protocolos descritos (Robzyk y Kassir, 1992). Las colonias transformantes protótrofas para Leu confirmadas por PCR se inocularon en 5 mL de SC-Leu e incubaron a 30 °C toda la noche en agitación 200 rpm. Se centrifugaron los cultivos nocturnos a 13200 $\times g$, 20 s y se les agregó 400 μL del tampón de lisis STET (sacarosa 8 %, Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM, Triton X-100 5 %) junto con bolitas de vidrio (0,45 mm). Se agitaron vigorosamente durante 5 min y luego se sometieron a un choque térmico de 1 min a 100 °C. Las muestras se centrifugaron a 13200 $\times g$ durante 10 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Se agregó 200 μL de acetato amónico 7,5 M, se incubó durante 1 h a -20 °C y se precipitó el DNA con etanol al 70 %. Se resuspendió el DNA (plasmídico) con agua MiliQ-estéril y se usaron 2 μL para electroporar las células de *E. coli* y rescatar el plásmido.

16.3. Complementación funcional de genes *PMT* de *P. digitatum* en levaduras

El plásmido pGREG505 (Jansen *et al.*, 2005) fue usado para el análisis funcional de los genes *PMT* de *P. digitatum* en las cepas deletantes en genes *PMT*

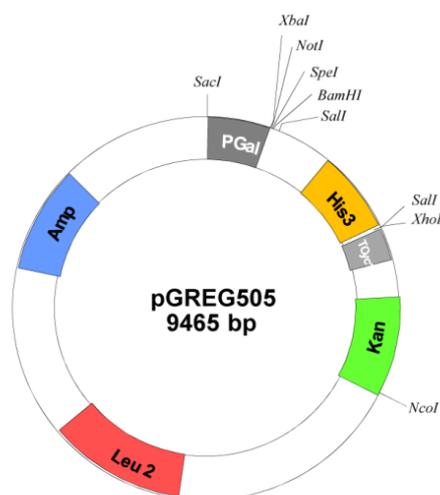


Figura 12. Mapa del plásmido pGREG505.

Se indican los sitios de corte *SaI* para desplazar el gen de histidina (His3) durante la recombinación homóloga y la localización de los marcadores de resistencia a los antibióticos de ampicilina (Amp) y kanamicina (Kan), el gen de biosíntesis de leucina (Leu2) y el promotor *GAL1* (PGal).

de *S. cerevisiae*. Se siguió la estrategia descrita (Jansen *et al.*, 2005), en la cual la recombinación homóloga *in vivo* en levaduras es factible alrededor del sitio de corte *SaI* de pGREG505 (**Figura 12**), mediante el diseño de un par de oligonucleótidos que contengan en sus extremos secuencias complementarias (rec1 y rec2) y que permitan fusionar el gen de interés bajo el control del promotor inducible del gen *GAL*.

Siguiendo esta metodología se diseñaron los oligonucleótidos OJM258/259, OJM260/261 y OJM262/263 (**Tabla 10**) para amplificar las regiones codificantes de los genes *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4*, respectivamente incluyendo las 50 pb correspondientes a las regiones del plásmido. Los fragmentos de PCR junto con el vector pGREG505 linearizado con *SaI* se usaron para transformar las levaduras por el método de transformación de acetato de litio descrito previamente (Gietz *et al.*, 1992) y los transformantes se seleccionaron por prototrofia para Leu en medio SC-Leu.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la complementación funcional con pGREG505.

| Gen | Nombre | Uso | Secuencia 5' - 3' | Thib (°C) |
|-------------|--------|-----|---|-----------|
| <i>PMT1</i> | OJM258 | F | GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGGCACAG AAAGCAAAGGAC | 62 |
| | | R | GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACTTATCTAG TGGCTTCATACC | |
| <i>PMT2</i> | OJM260 | F | GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGGTGGGC CTAGACACTGCC | 64 |
| | | R | GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACTCAGTTCA CATTTGCCATTTCC | |
| <i>PMT4</i> | OJM262 | F | GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGTCGTCA CCTTCGCCCTCTC | 62 |
| | | R | GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACTTATTTGG CAAAGTGCAGATCG | |

En rojo se resaltan las secuencias complementarias al vector pGREG505 (F: rec1 y R: rec2).

16.4. Ensayo de sensibilidad a blanco de calcofluor

Para comprobar la funcionalidad de las *PMT* de *P. digitatum* en levaduras se realizó un ensayo de sensibilidad al compuesto CFW sobre células inducidas con galactosa. Las cepas transformantes se crecieron en 5 mL de SC-Leu con 2 % de glucosa (fuente de carbono no inductora) e incubaron toda la noche a 30 °C, 200 rpm. Al día siguiente, se refrescaron a una DO_{600} 0,2, se lavaron las células con agua estéril (2 veces) y se precipitaron por centrifugación. Se inocularon en 5 mL de medio SC-Leu con 2 % de glucosa (condición de represión) o galactosa (condición de inducción) y crecieron a 30 °C, 200 rpm, durante 3, 6, 9 y 24 h. A cada tiempo de incubación, las células crecidas se llevaron a una DO_{600} 0,1, se hicieron diluciones seriadas 1/10 y se aplicaron 5 μ L en forma de gotas en cuatro placas distintas de medio de selección SC-Leu conteniendo alternativamente: 1) glucosa 2 %; 2) glucosa 2 % + CFW 12,5 μ g/mL; 3) galactosa 2 %; 4) galactosa 2 % + CFW 12,5 μ g/mL. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días.

17. Transformación de *P. digitatum*

Durante este trabajo de tesis doctoral se optimizó un protocolo de transformación genética de *P. digitatum* mediada por la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT, del inglés “*A. tumefaciens* mediated transformation”) sobre conidios del hongo, basándonos en protocolos previos (De Groot *et al.*, 1998; Khang *et al.*, 2005; Michielse *et al.*, 2005; Khang *et al.*, 2007; Wang y Li, 2008), y utilizando los plásmidos binarios pBht2 (Mullins *et al.*, 2001) y pGKO2 (Khang *et al.*, 2007) que contienen el T-DNA de *Agrobacterium* desarrollados por el grupo del Dr. Seogchan Kang (The Pennsylvania State University, Pennsylvania, EE.UU.).

17.1. Construcciones para la disrupción de los genes *PMT* de *P. digitatum*

En la **Figura 13** se representa un esquema general de la técnica PCR de fusión (Szewczyk *et al.*, 2006), que hemos usado para obtener las construcciones para la disrupción de los genes *PMT* interrumpiendo sus secuencias génicas con el casete de resistencia de higromicina (Hyg^R). Para ello, se diseñaron pares de oligonucleótidos que amplificaron las regiones 5´ y 3´ del gen de interés (P1/P2 y P3/P4). Los oligonucleótidos centrales (P2 y P3) presentaron en sus extremos secuencias complementarias a los extremos del casete de Hyg^R amplificado con los cebadores OJM197 y OJM198.

En la **Tabla 11** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes *PMT* de *P. digitatum*. Se amplificaron por PCR y de forma independiente los fragmentos de las regiones 5´ y 3´ de cada gen *PMT* del DNA genómico del hongo (**Tabla 11**) y el casete Hyg^R con los oligonucleótidos OJM197 y OJM198 del vector pBht2 (Mullins *et al.*, 2001). Estos tres amplicones obtenidos independientemente se purificaron por columna y utilizaron simultáneamente como molde para la PCR de fusión con los oligonucleótidos más externos (P1/P4) (**Figura 13**). El producto de amplificación de la PCR final se confirmó por electroforesis en gel de agarosa, se clonó en el vector “pGEM-T-Easy” (Promega), y se transformó por electroporación en *E. coli*. Las

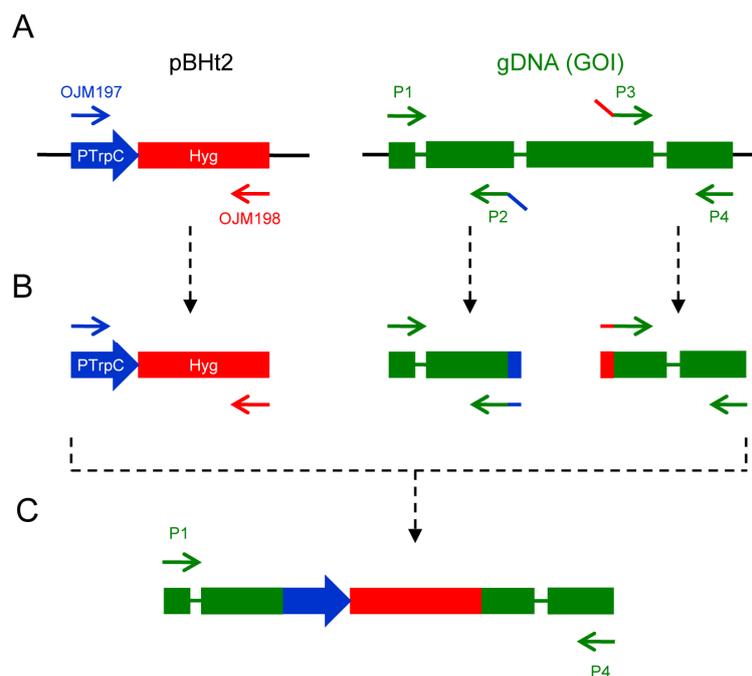


Figura 13. Esquema de la estrategia de PCR de Fusión para la interrupción génica con el casete de higromicina.

A) Localización de los tres pares de oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR, B) Fragmentos amplificados para cada combinación y C) PCR de fusión con los tres productos amplificados individualmente en B.

colonias transformantes obtenidas se confirmaron por PCR y posteriormente los plásmidos resultantes por secuenciación de DNA (SCSIE, UV).

Los tres vectores para la interrupción de los tres genes *PMT* en el vector pGEM-T, se digirieron con enzimas de restricción adecuadas, y subclonaron en el vector binario pGKO2 (Khang *et al.*, 2005; Khang *et al.*, 2007). Este es un vector diseñado para facilitar la identificación de recombinaciones homólogas sobre el *locus* genético deseado, descartando las inserciones ectópicas al azar del T-DNA de *Agrobacterium*.

En la **Figura 14** se muestra el mapa de pGKO2, y se observa que posee el gen de la tiamina quinasa del virus simple del herpes (HSV tk). Este gen es eliminado en los transformantes que presenten la recombinación homóloga en la

Tabla 11. Oligonucleótidos usados para las construcciones de disrupción y expresión constitutiva de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Gen | Nombre | Uso | Secuencia 5' - 3' | Thib (°C) | Caracteres |
|-------|--------|-----|---|-----------|------------------|
| PMT1 | OJM187 | F | GTTAACATGGCACAGAAAGCAAAGGA | 62 | HpaI |
| | OJM188 | R | GTTAACCTATCTAGTGGCTTCATTAC | 62 | HpaI |
| | OJM215 | R | ATGCTCCTTCAATATCAGTTAACGCGC CCTGGCTGTTTCAGATGGC | 62 | Hyg-5' |
| | OJM216 | F | CCGACCGGGAACCAGTTAACACTCGCC GTTGGAATCTATCTT | 62 | Hyg-3' |
| PMT2 | OJM150 | F | CGCTCTGGTTCCTGATCCCG | 64 | |
| | OJM189 | F | GTTAACATGGTGGCCTAGACACTGC | 62 | HpaI |
| | OJM190 | R | GTTAACTCAGTTCACATTTGCCAT | 62 | HpaI |
| | OJM217 | R | ATGCTCCTTCAATATCAGTTAACGCTT CAGGTCGCCAAATTTATTCC | 62 | Hyg-5' |
| | OJM218 | F | CCGACCGGGAACCAGTTAACCGCCAT CCGGTCTTAGGCTGCT | 62 | Hyg-3' |
| | OJM287 | F | GTA TAGGAATGCAGGTAAGG | 62 | |
| | OJM288 | R | GAGTGCAGAAGCCCTACTCC | 64 | |
| | OJM344 | R | GTTGCTAAATCCACAGTACG | 58 | |
| PMT4 | OJM191 | F | GTTAACATGTCGTCACCTTCGCCCTC | 62 | HpaI |
| | OJM192 | R | GTTAACCTATTGGCAAAGTGCAGA | 62 | HpaI |
| | OJM207 | F | CTCGTTGAAGAAGCATAATGATCC | 62 | |
| | OJM210 | R | GGTAGGTAGTGATGCAGGAAGC | 62 | |
| | OJM208 | R | ATGCTCCTTCAATATCAGTTAACGCCA TCGAAGCCCAAGCCAACC | 62 | Hyg-5' |
| | OJM209 | F | CCGACCGGGAACCAGTTAACGTGGAA CCTCTTGATATCAACC | 62 | Hyg-3' |
| PgpDA | OJM195 | F | CCTGCAGGTACCTCGAGTACCATTTAA TTC | 64 | PstI, KpnI, XhoI |
| | OJM196 | R | CCCGGGAGCCATGGTGATGCTCTGCTCA AG | 64 | SmaI, NcoI |
| Hyg | OJM197 | F | CGTTAACTGATATTGAAGGAGCAT | 55 | HpaI |
| | OJM198 | R | TGTTAACTGGTTCCTCCGGTCGG | 55 | HpaI |
| | OJM231 | F | GTTGCAAGACCTGCCTGAAACC | 60 | |
| | OJM232 | R | GTTTGCCAGTGATACACATGGG | 60 | |
| HSVtk | OJM311 | F | CCACGGAAGTCCGCCCGGAGC | 60 | |
| | OJM312 | R | GACGTGCATGGAACGGAGGCG | 60 | |

región deseada del genoma del hongo, pero no se pierde en los transformantes de integración ectópica. La *HSVtk* transforma el compuesto 2 Fluoro-deoxi-uridina (F2dU) en tóxico actuando como un marcador de selección negativa.

Los plásmidos positivos pGKO2_pmt1, pGKO2_pmt2 y pGKO2_pmt4 se transformaron por electroporación en *A. tumefaciens* (AGL1), y las cepas resultantes se utilizaron posteriormente para la transformación de *P. digitatum*.

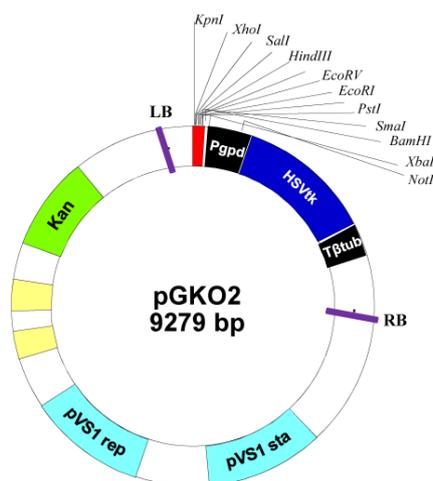


Figura 14. Mapa del vector binario pGKO2.

Se indican los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA y la ubicación del gen de tiamina quinasa del virus simple del herpes (HSVtk) bajo el control del promotor gliceraldehído-3-fosfato de *Cochliobus heterostrophus* (*Pgpd*) y el terminador de β -tubulina de *N. crassa* (*T β tub*). En rojo de muestra el sitio de clonación múltiple y en verde el marcador de resistencia al antibiótico de kanamicina (Kan).

17.2. Construcciones para la expresión constitutiva de los genes *PMT* de *P. digitatum*

Las construcciones para la expresión constitutiva de cada uno de los genes *PMT* de *P. digitatum* se generaron usando el vector binario pBht2 (Mullins *et al.*, 2001). Este vector contiene el casete Hyg^R para la selección de los transformantes del hongo (**Figura 15**).

El promotor del gen de la gliceraldehído trifosfato deshidrogenasa (*gpdA*) de *A. nidulans* fue usado para dirigir la expresión heteróloga y constitutiva de los distintos genes *PMT*. Este promotor se amplificó por PCR del vector pTAS5 (Punt, 1987) con los pares de oligonucleótidos OJM195 y OJM196 (**Tabla 11**), se clonó en el vector pGEM-T, se confirmó por secuenciación y el inserto resultante se subclonó en el vector pBht2 con las endonucleasas *Pst*I/*Sma*I, generando el plásmido pBht2_PgpdA.

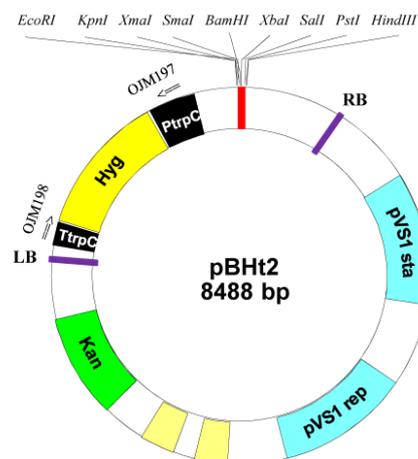


Figura 15. Mapa del vector binario pBht2.

Se indican los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA y la ubicación del marcador de resistencia a higromicina (Hyg) bajo el control del promotor del triptófano de *A. nidulans* (PtrpC). En rojo se muestra el sitio de clonación múltiple y en verde el gen del antibiótico kanamicina (Kan).

Por otro lado, las secuencias completas de los genes *PMT1*, *PMT2* y *PMT4* se amplificaron por PCR con las parejas de oligonucleótidos OJM187/OJM188; OJM189/OJM190 y OJM191/OJM192 (**Tabla 11**) que contienen un sitio de corte *Hpa*I en los extremos 5' y 3' de cada gen. Los tres fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T y los plásmidos obtenidos se digirieron con la enzima *Hpa*I para *PMT1* y *PMT2* y con *Hpa*I y *Spe*I para *PMT4* y se purificaron por columna (Kit PrepEase, USB). En el caso de *PMT4*, el producto de digestión se trató con la polimerasa Klenow (Amsherman) para el relleno del extremo cortado con la enzima *Spe*I. Los insertos resultantes se subclonaron en pBht2_PgpdA digerido con la enzima *Sma*I y defosforilado con fosfatasa alcalina (SAP). En los plásmidos obtenidos pBht2_pmt1, pBht2_pmt2 y pBht2_pmt4 se analizó la correcta orientación (en sentido) de cada gen *PMT* bajo el promotor *gpdA*, mediante análisis de restricción y/o PCR orientadas. Los plásmidos positivos se confirmaron por secuenciación y transformaron en *A. tumefaciens* (AGL1).

17.3. Transformación genética de *P. digitatum* mediada por *A. tumefaciens*

La ATMT consiste básicamente en tres pasos sucesivos: 1) La inducción con acetosiringona (AS) del cultivo de *Agrobacterium* portador del plásmido apropiado; 2) la co-incubación del mismo con la suspensión de conidios sobre placas con medio sólido, y 3) la selección de transformantes sobre placas de medio con los antibióticos adecuados (Michielse *et al.*, 2005). El uso de AS es imprescindible para la inducción de los genes *VIR* de *Agrobacterium*, los cuales son responsables de traspasar el T-DNA plasmídico al genoma del hongo (De Groot *et al.*, 1998).

En este trabajo se utilizó el procedimiento descrito por el grupo del Dr. Kang (Khang *et al.*, 2005; Khang *et al.*, 2007) con algunas modificaciones. Se comprobó que una concentración de 13 µg/mL de higromicina B inhibió completamente el crecimiento de la cepa PHI26 confirmando que este antibiótico puede ser utilizado como un marcador de resistencia para la selección de transformantes. Por otro lado, se utilizó el método descrito por (Michielse *et al.*, 2008) para el crecimiento de la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* en medio de inducción (IM + 200 µM AS). Se comprobó que siguiendo este procedimiento, luego de 6 h de incubación bajo condiciones de inducción a 28 °C se alcanza la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,6).

En la **Tabla 12** se muestra la composición de los distintos medios y tampones utilizados y en la **Figura 16** el flujo seguido para la obtención de transformantes y cuyos pasos se detallan a continuación:

a. Preparación de *Penicillium digitatum*

Se usó un cultivo de la cepa PHI26 crecido en placa de PDA durante 7 días a 24 °C, se recogieron y resuspendieron los conidios en agua estéril. Se realizó el recuento con un cuenta glóbulos y se preparó una suspensión de 1×10^6 ó de 1×10^8 conidios/mL dependiendo del ensayo.

b. Inducción de *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó un cultivo fresco de la cepa AGL1 portadora del vector binario según el experimento previsto. Se repicó una colonia individual en 10 mL de medio líquido MM (**Tabla 12**) con 75 µg/mL de kanamicina, e incubó a 28 °C durante 3 días en agitación 250 rpm. Se comprobó que su densidad óptica a 600 nm sea mayor o igual a 1 y se centrifugó 1 mL del pre-cultivo a 3960 *xg* durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron con 250 µL de medio líquido IM con kanamicina (75 µg/mL) y AS 200 µM (**Tabla 12**), y se volvió a centrifugar a 3960 *xg*, 5 min. Se resuspendió en 1 mL del medio líquido IM + AS e inoculó en 4 mL de medio IM + AS. Se incubó a 28 °C con agitación 250 rpm durante aproximadamente 6 h hasta obtener una $DO_{600} \sim 0,6$.

c. Co-cultivo de *Agrobacterium*-hongo

Se mezclaron 100 µL de las células inducidas de *A. tumefaciens* $DO_{600} \sim 0,6$ (equivalente a 4×10^8 CFU/mL) con 100 µL de las esporas del hongo (generalmente 1×10^6 conidios/mL). Se sembraron los 200 µL esta mezcla sobre membranas de nitrocelulosa depositadas en placas de medio CM + AS (200 µM) (**Tabla 12**), que se incubaron a 24 °C durante 2 ó 3 días de co-cultivo, dependiendo del ensayo.

d. Selección de transformantes

Se transfirieron los filtros co-cultivados a placas de PDA con cefotaxima (100 µg/mL) y moxalactam (100 µg/mL) para eliminar el fondo bacteriano e higromicina B (13 ó 50 µg/mL, dependiendo del experimento) para la selección de los transformantes fúngicos. Las membranas fueron depositadas boca abajo, en contacto con el medio durante 10 min y luego se las dio vuelta. Estas placas se incubaron a 24 °C durante 5-7 días, monitorizando la aparición de colonias Hyg^R.

Tabla 12. Soluciones y medios usados para la transformación genética de *P. digitatum*.

| Reactivos | Soluciones (100 mL) | | Composición (1000 mL) | | |
|--------------------------------------|---|----------|-----------------------|--------|--------|
| | Químico | Cantidad | MM | IM | CM |
| Tampón Fosfato Potásico pH 7,0 | K ₂ HPO ₄ | 20 g | 10 mL | 10 mL | 10 mL |
| | KH ₂ PO ₄ | 14,5 g | | | |
| Solución M-N | MgSO ₄ •7H ₂ O | 3 g | 20 mL | 20 mL | 20 mL |
| | NaCl | 1,5 g | | | |
| CaCl ₂ 1 % | CaCl ₂ •2H ₂ O | 1 g | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Oligoelementos | ZnSO ₄ •7H ₂ O | 0,01 g | 10 mL | 10 mL | 10 mL |
| | CuSO ₄ •5H ₂ O | 0,01 g | | | |
| | H ₃ BO ₃ | 0,01 g | | | |
| | MnSO ₄ •H ₂ O | 0,01 g | | | |
| | Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O | 0,01 g | | | |
| NH ₄ NO ₃ 20 % | NH ₄ NO ₃ | 20 g | 2,5 mL | 2,5 mL | 2,5 mL |
| Glucosa 20 % | Glucosa | 20 g | 10 mL | 10 mL | 5 mL |
| FeSO ₄ 0,01 % | FeSO ₄ | 0,01 g | 10 mL | 10 mL | 10 mL |
| Glicerol 50 % | Glicerol | 50 mL | | 10 mL | 10 mL |
| MES 1 M pH 5,3 | MES | 21,32 g | | 40 mL | 40 mL |
| Agua Mili-Q estéril | | | 935 mL | 885 mL | 890 mL |
| Kanamicina 50 mg/mL | | | 1,5 mL | 1,5 mL | 1,5 mL |
| Acetosiringona 200 mM | | | | 2 mL | 2 mL |
| Agar | | | | | 15 g |

Medios utilizados: Medio mínimo (MM), Medio de inducción (IM) y Medio de co-cultivo (CM). Las soluciones de glucosa, FeSO₄, kanamicina y MES se esterilizaron por filtración (0,02 µm) y el resto se autoclavaron a 120 °C, 20 min. Se mantuvieron a 4 °C, excepto las soluciones de FeSO₄, kanamicina, acetosiringona y MES se almacenaron a -20 °C.

Las colonias transformantes que aparecieron sobre la nitrocelulosa (**Figura 16**) se transfirieron individualmente a placas de 24 pocillos conteniendo PDA + Hyg (13 ó 50 µg/mL) y se crecieron a 24 °C durante 7 días para confirmar la resistencia. Posteriormente, se sembró por estrías una suspensión de conidios de cada uno en placas grandes (9 cm) de PDA + Hyg (13 ó 50 µg/mL) e incubaron a 24 °C; 2 días. Finalmente se recuperaron los cultivos monospóricos en placas de PDA + Hyg (50 µg/mL).

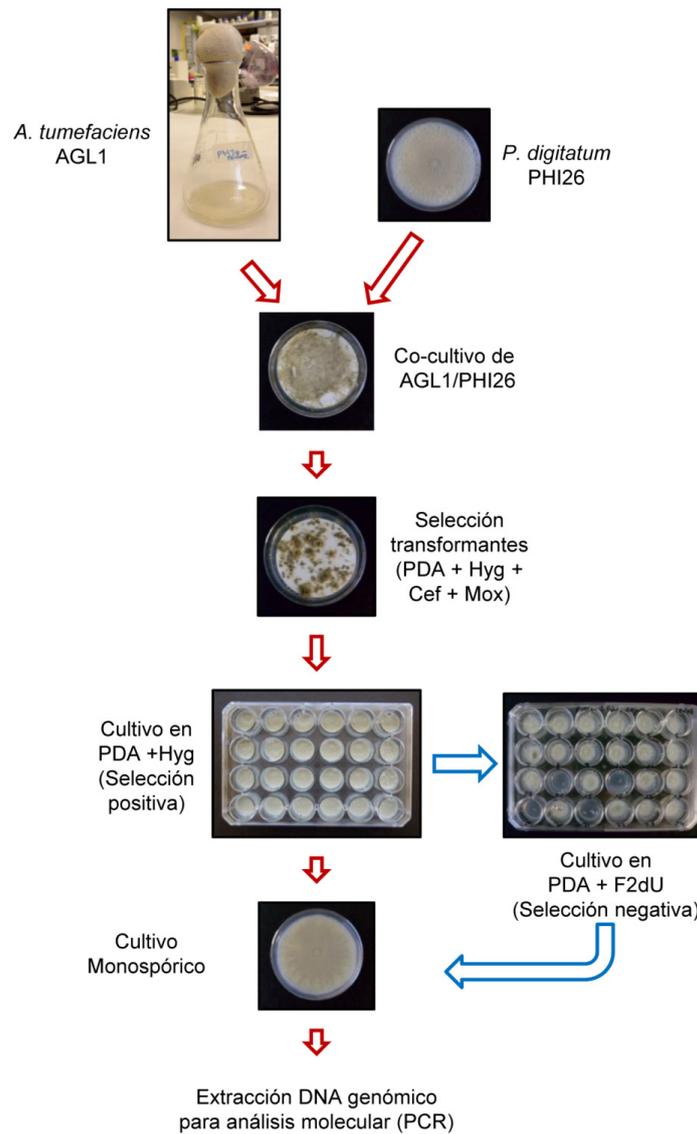


Figura 16. Esquema del protocolo para la transformación genética de *P. digitatum* mediado por *A. tumefaciens*.

Las flechas en rojo indican los pasos seguidos con las construcciones en el vector pBHt2 y en azul se muestra el paso adicional de selección negativa en F2dU en el caso del vector pGKO2.

Además, en el caso del vector pGKO2 hubo una etapa adicional en el esquema seguido de ATMT que consistió en inocular 5 μ L de cada suspensión de

conidios en placas de 24 pocillos con medio PDA + F2dU (10 μ M) para la selección negativa de los transformantes ectópicos con el gen de tiamina quinasa. Estas placas se incubaron a 24 °C durante 7 días y luego se obtuvieron los cultivos monospóricos de los transformantes Hyg/F2dU resistentes. Las cepas fúngicas transformantes obtenidas se mantuvieron en 20 % de glicerol a -80 °C, y posteriormente se analizaron molecularmente.

18. Programas y bases de datos utilizados

Los programas bioinformáticos y las bases de datos empleadas durante esta tesis se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Programas bioinformáticos y bases de datos empleadas en este trabajo.

| Programas | Uso |
|-------------------|--|
| BLAST | Búsqueda de homologías de secuencias nucleotídicas y aminoácidas http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| NCBI | Base datos del National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| Broad Insitute | Base de datos del Broad Institute de Harvard http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data |
| Yeast genome | Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i> http://www.yeastgenome.org/ |
| DNAMAN v4.03 | Análisis de secuencias http://www.lynnon.com/ |
| Primer 3 plus | Diseño de oligonucleótidos específicos http://biotools.umassmed.edu |
| Gene Runner v3.05 | Análisis de los oligonucleótidos diseñados (complementariedad) Gene Runner (Versión 3.05) |
| Clustal W | Análisis de secuencias http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html |
| Mega 5 | Análisis filogenético (Tamura, <i>et al.</i> , 2011) http://www.megasoftware.net/ |
| Drawtree | Construcción de arboles filogenéticos http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/one_task.cgi?task_type=drawtree |
| pDRAW32 v.1.1.114 | Contrucción de mapas de vectores usados http://www.acaclone.com/ |
| MatInspector | Posibles sitios de unión a factores de transcripción http://www.genomatix.de |
| SMART | Búsqueda de homologías en base de datos de proteínas http://smart.embl-heidelberg.de |
| Pfam | Búsqueda de homologías en base de datos de proteínas http://pfam.sanger.ac.uk/ |
| TMHMM v2.0 | Predicción de hélices transmembranas en las proteínas http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ |
| NetOGlyc | Potenciales sitios de O-glicosilación http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/ |
| NetNGlyc | Potenciales sitios de N-glicosilación http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/ |



RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización del mecanismo de acción de péptidos antifúngicos sobre *S. cerevisiae*. Implicación de genes de la glicosilación de proteínas

Como se ha indicado en la Introducción, nuestro grupo ha venido utilizando la levadura *S. cerevisiae* como un microorganismo modelo en la caracterización del mecanismo de acción de PAF26 y de otros péptidos antimicrobianos. Un estudio transcriptómico demostró, entre otras cuestiones, la inducción e implicación de genes relacionados con el metabolismo de arginina durante la interacción con PAF26, así como la inducción de genes estructurales de pared celular por la exposición a péptidos de distintos modos de acción (López-García *et al.*, 2010a). En este apartado se ha profundizado en la caracterización del mecanismo de acción de PAF26 sobre *S. cerevisiae*.

1.1. Genes que determinan la susceptibilidad frente a PAF26 y a compuestos desestabilizantes de pared celular en *S. cerevisiae*

Los análisis previos de los datos de transcriptómica mediante ontología génica (GO) indicaron que la única anotación funcional significativa coincidente entre los genes que se inducen durante la exposición a PAF26 o a melitina en levadura es la relacionada con "pared celular de hongos" (López-García *et al.*, 2010a), entre los cuales se destacan *ECM33*, *PIR2* y *PIR3*. Por otra parte, genes del "metabolismo de arginina y grupos amino" como son *ARG1*, *ARG3* y *ARG7* se inducen específicamente por PAF26 pero no por melitina.

La **Figura 17**, muestra los fenotipos de algunos de los mutantes caracterizados previamente correspondientes a estos genes. Entre estos se encuentran los mutantes resistentes $\Delta arg1$ y $\Delta ipt1$, que codifican la arginino-succinato sintetasa de la biosíntesis de arginina y el metabolismo de la urea y el enzima terminal de la biosíntesis del glicosfingolípido de membrana M(IP)2C (manosa inositol-fosfato-(2) ceramida), respectivamente. En cambio, el mutante

Δecm33, cuyo gen codifica una glicoproteína de pared celular, resultó ser más sensible frente al péptido PAF26. Los tres mutantes presentaron los mismos niveles de susceptibilidad que la cepa parental BY4741 frente al péptido melitina. Es muy significativo el fenotipo diferencial con respecto a SDS (**Figura 17**) o CFW (datos no mostrados), en el cual se refleja la integridad de la pared celular y demuestra las tres posibilidades de respuesta a la compleja interacción con PAF26. En este sentido, el mutante *Δipt1* mostró un fenotipo de resistencia frente a PAF26 combinado con una mayor sensibilidad a SDS. El mutante *Δecm33* exhibió una mayor sensibilidad frente a todos los compuestos antifúngicos (SDS, CFW y al péptido PAF26). Finalmente el mutante *Δarg1* que también fue resistente a PAF26 no tuvo afectada su pared celular ya que no hubo variaciones en su susceptibilidad frente a CFW y SDS.

La mayoría de los genes de pared celular que se inducen por la exposición a PAF26, codifican proteínas potencialmente glicosiladas (datos no mostrados), lo que es consistente con la estructura de la pared celular de hongos (ver Introducción). En base a estas observaciones previas, en nuestro grupo se realizó un experimento inicial de escrutinio de la sensibilidad de 37 cepas deletantes de

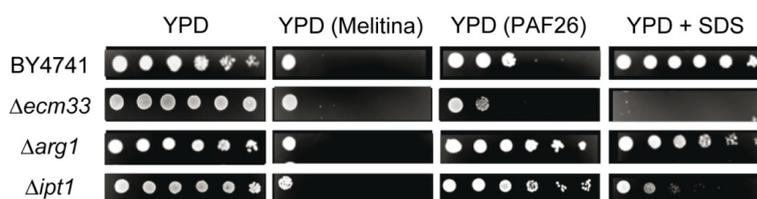


Figura 17. Análisis de la sensibilidad de las cepas deletantes en los genes *ECM33*, *ARG1* e *IPT1* y la cepa parental BY4741 de *S. cerevisiae* frente a distintos compuestos antifúngicos.

Se aplicaron gotas de 5 μ L de 1×10^7 UFC/mL y diluciones seriadas 1/5 de las distintas cepas tratadas durante 24 h con los péptidos melitina (32 μ M) y PAF26 (64 μ M) sobre placas de medio sólido YPD sin péptido (paneles centrales). Crecimiento de gotas de 5 μ L de diluciones seriadas de las mismas cepas deletantes (sin tratar con péptidos) sobre placas de medio YPD (panel izquierdo, control) y suplementado con 0,03 % de SDS (panel derecho). Se incubaron a 30 $^{\circ}$ C durante 2 días.

S. cerevisiae relacionadas con la glicosilación de proteínas. En el presente trabajo de tesis, se exploran en detalle determinados aspectos de los mutantes más significativos encontrados en este escrutinio.

En la **Figura 18** se observa los resultados más representativos de los ensayos de sensibilidad realizados frente a PAF26, CFW y SDS. Principalmente, se muestran los mutantes que resultaron resistentes frente al tratamiento de PAF26, como $\Delta eos1$, $\Delta alg5$, $\Delta mnn5$ y $\Delta pmt2$. Entre ellos se encuentran (ver también Introducción): *EOS1*, cuyo gen participa en el proceso de N-glicosilación de proteínas (Nakamura *et al.*, 2007), *ALG5*, cuyo gen codifica para la UDP-glucosa-dolicol-fosfato glucosiltransferasa, que carga el dolicolfosfato (Dol-P) con residuos de glucosa para ser utilizado durante la elongación del precursor de N-glicanos en el retículo endoplasmático (ER) (Heesen *et al.*, 1994); *MNN1* y *MNN5* que codifican para manosiltransferasas que decoran con residuos de manosa a los N- y O-glicanos (Rayner y Munro, 1998) y los genes *PMT* que codifican para las enzimas encargadas de transferir el primer residuo de manosa durante el primer paso de O-glicosilación en el ER (Tanner *et al.*, 1995). Significativamente, los fenotipos de $\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$ fueron los que mostraron una marcada resistencia

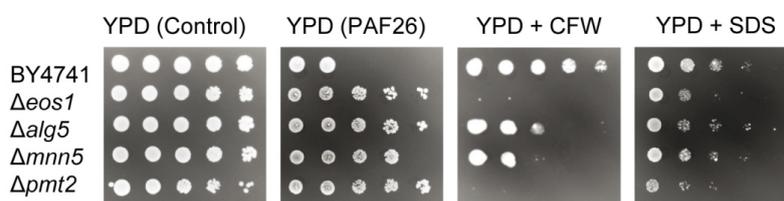


Figura 18. Análisis de la sensibilidad de las cepas deletantes en genes de glicosilación de proteínas de *S. cerevisiae* frente al péptido PAF26 y compuestos relacionados con defectos en la síntesis de pared celular.

Muestras de 5 μ L de 1×10^7 UFC/mL y diluciones seriadas 1/5 de las cepas $\Delta eos1$, $\Delta alg5$, $\Delta mnn5$, $\Delta pmt2$ y la cepa parental BY4741 tratada con el péptido PAF26 (64 μ M) durante 24 h se aplicaron sobre placas de medio sólido YPD (sin péptido). Crecimiento de gotas de 5 μ L de diluciones seriadas de las mismas cepas deletantes sobre placas de medio YPD (control) y suplementado con 12,5 μ g/mL de CFW o 0,03 % de SDS. Se incubaron a 30 °C durante 2 días.

frente al tratamiento con PAF26, a pesar de tener afectada su pared celular como lo demuestran su sensibilidad incrementada a CFW o SDS. Este es un fenotipo similar al del mutante $\Delta ipt1$ (**Figura 17**) que se ha caracterizado ampliamente en la literatura (Thevissen *et al.*, 2000; Im *et al.*, 2003; López-García *et al.*, 2010a), y por ello los mutantes $\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$ fueron estudiados con detalle.

1.2. Estudio comparado de la actividad inhibitoria y fungicida de PAF26 y otros péptidos antimicrobianos sobre mutantes de N- y O-glicosilación relevantes

Posteriormente, con el propósito de investigar si los dos genes *EOS1* y *PMT2*, pertenecientes a la N- y O-glicosilación, respectivamente, también intervienen en la respuesta frente a otros péptidos antimicrobianos se realizaron ensayos para determinar el número de unidades formadoras de colonias viables tras la exposición a distintas concentraciones de los péptidos. Como se observa en la **Tabla 14** entre los péptidos analizados se encuentran: el péptido P113, derivado de histatina 5, que también es un péptido antifúngico del tipo penetratina (Jang *et al.*, 2008); la cecropina A que es un péptido natural conocido por su actividad antibacteriana, y también antifúngico (Steiner *et al.*, 1981; De Lucca *et al.*, 1997); y de nuevo la melitina como péptido antimicrobiano de reconocida acción citolítica (Terwillinger y Eisenberg, 1982).

Para determinar los valores MIC para cada uno de los AMP se realizaron experimentos dosis-respuesta con los diferentes péptidos (PAF26, P113, cecropina A, melitina) en un intervalo de concentraciones entre 4 y 256 μM sobre la cepa parental BY4741 y las cepas deletantes seleccionadas ($\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$).

En la **Figura 19** se muestran las curvas obtenidas a partir de los recuentos de las UFC/mL viables para 3 de los 4 péptidos analizados. Se confirmó la resistencia incrementada en los dos mutantes previamente caracterizados ($\Delta eos1$ y $\Delta pmt2$) frente al péptido PAF26, observando en estos experimentos un valor MIC de 64 μM para ambos, dos veces superior al observado en la cepa parental (32 μM). En el caso de P113, la resistencia de dichos mutantes no fue tan

Tabla 14. Valores inhibitorios de los distintos péptidos ensayados frente a las cepas seleccionadas de la levadura *S. cerevisiae*.

| Péptidos | MIC (μM) | | |
|-------------|-----------------------|---------------|---------------|
| | BY4741 | $\Delta eos1$ | $\Delta pmt2$ |
| PAF26 | 32 | 64 | 64 |
| P113 | 128 | 256 | 256 |
| Melitina | 32 | 32 | 16 |
| Cecropina A | 32 | 32 | 16 |

concluyente debido a que bajo nuestras condiciones experimentales la actividad antifúngica del péptido fue muy baja (**Figura 19B**) como lo demuestra su elevado valor MIC registrado sobre la cepa parental (128 μM) comparado con el resto de péptidos analizados. En este caso, los mutantes $\Delta eos1$ y $\Delta pmt2$ presentaron un valor MIC superior o igual a 256 μM . Por otro lado, en lo que respecta a aquellos péptidos como cecropina A y melitina, que actúan sobre las membranas celulares, ambos mutantes ($\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$) no mostraron una resistencia incrementada comparado con la cepa parental BY4741 (**Tabla 14**). De hecho, $\Delta pmt2$ fue más sensible a ambos péptidos. Este resultado puede ser debido a que presentan su pared celular debilitada (**Figura 18**) y por tanto esto favorece de alguna manera a que fueran hipersensibles frente a péptidos fundamentalmente citolíticos. Este fenotipo de mayor sensibilidad fue más claro en la cepa mutante $\Delta pmt2$ tratada con melitina como lo demuestra la curva de viabilidad obtenida (**Figura 19**).

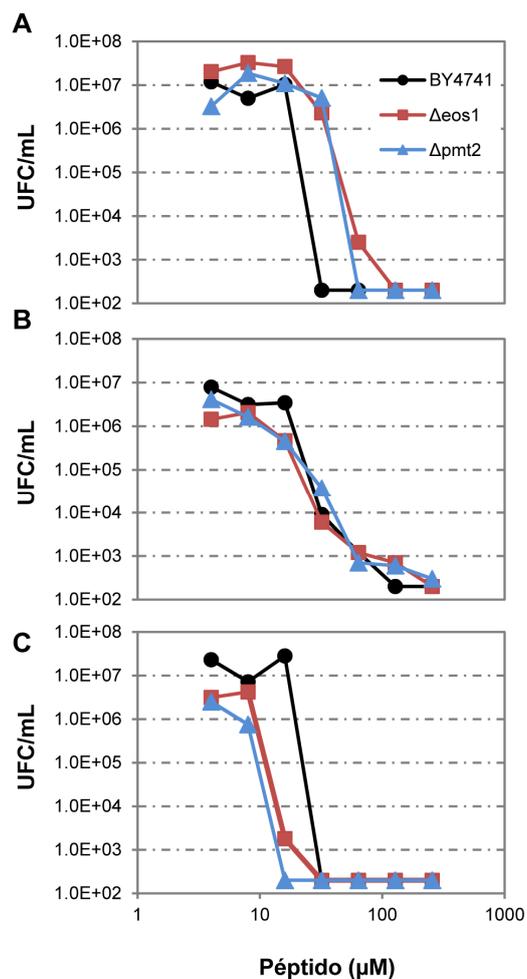


Figura 19. Curvas dosis-respuesta de la actividad microbicida de los péptidos PAF26 (A), P113 (B) y melitina (C) frente a las cepas deletantes $\Delta eos1$, $\Delta pmt2$ y la cepa parental BY4741 de *S. cerevisiae*.

Las células fueron expuestas a distintas concentraciones de los péptidos ensayados de 4 a 256 μM durante 24 h y 5 μL de diluciones seriadas 1/5 de cada tratamiento fueron aplicadas en forma de gotas sobre placas de YPD (sin péptido). Los datos se representan en escala logarítmica como el valor medio del número de UFC/mL viables calculado de dos repeticiones.

1.3. Interacción y localización del péptido PAF26 y sus derivados sobre *S. cerevisiae*

El fluoróforo FITC unido covalentemente al extremo N-terminal de PAF26 permitió demostrar que el péptido es capaz de penetrar en las hifas y conidios de *P. digitatum* por un proceso no disruptivo de membranas celulares (Muñoz *et al.*, 2006). Recientemente, y en colaboración con el grupo del Dr. Nick D. Read (Universidad de Edimburgo), se han descrito las etapas involucradas en la interacción de PAF26 con el hongo filamentoso modelo *N. crassa* utilizando el péptido marcado con tetrametilrodamina (TMR) (Muñoz *et al.*, 2012) (ver también Introducción y Discusión). Este fluoróforo ha demostrado ser más fiable que FITC para estos estudios de microscopía, ya que presenta mayor intensidad de emisión y estabilidad bajo nuestras condiciones experimentales.

Previamente a esta tesis doctoral, el péptido FITC-PAF26 había sido usado sobre *S. cerevisiae* en experimentos de localización celular (López-García *et al.*, 2010a). A pesar de la utilización en este estudio anterior de microscopía de fluorescencia no confocal, la combinación con otras sondas fluorescentes sugirió que PAF26 también se internaliza en células de levadura, aunque fueron necesarias concentraciones mayores de péptido (30 μM) para visualizar la interacción. En este apartado, decidimos utilizar el péptido marcado con el fluoróforo TMR y la microscopía confocal con el propósito de profundizar en la interacción con la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*. Estos experimentos de microscopía con levadura fueron realizados durante las estancias en el Laboratorio del "Fungal Cell Biology Group" del Dr. Read (Universidad de Edimburgo, Reino Unido). Esta parte del trabajo tenía además el objetivo de determinar si existen paralelismos con lo observado por los Dres. Muñoz y Read en la interacción del péptido con *N. crassa* (Muñoz *et al.*, 2012).

Se visualizó por microscopía confocal láser la interacción del péptido marcado TMR-PAF26 a una concentración sub-inhibitoria (2,5 μM) con la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* (**Figura 20**). Así, se pudo comprobar que el péptido sigue una serie de pasos secuenciales para internalizarse dentro de la célula y ejercer su actividad antifúngica, los cuales resultaron ser paralelos a los ya descritos para

N. crassa (Muñoz *et al.*, 2012). Como se muestra en las fotos representativas de dicho experimento se pueden observar hasta cinco patrones distintos de tinción, cada uno de los cuales corresponden a las diferentes localizaciones del péptido en toda la población celular analizada (**Figura 20B-C**). En la **Figura 20D1**, se puede observar con más detalle la señal roja de fluorescencia localizada principalmente alrededor de la superficie externa de la célula. Esto confirma que la unión a las envueltas celulares es uno de los pasos iniciales durante la interacción de PAF26 en las células de levadura. Posteriormente, y cuando el péptido pasa al interior de la célula, la señal de fluorescencia TMR-PAF26 se detecta primero en estructuras u orgánulos tipo endosomas o vacuolas, los cuales se van fusionando en una única vacuola que se agranda y ocupa gran parte del espacio intracelular (**Figura 20D2-3**). Finalmente, la fluorescencia es expulsada de las vacuolas en un proceso activo que vacía la vacuola, e invade todo el citoplasma, coincidiendo con la muerte

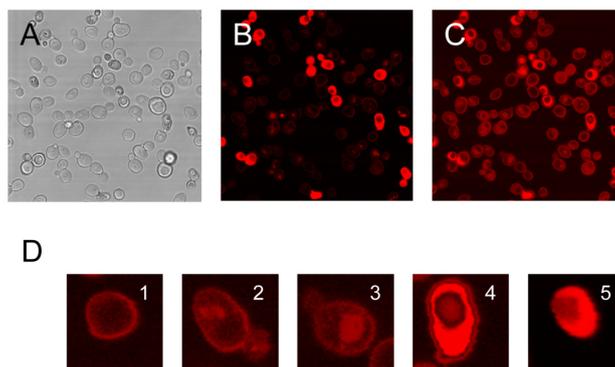


Figura 20. Localización del péptido TMR-PAF26 en *S. cerevisiae* BY4741 mediante microscopía confocal láser.

Las células 1×10^6 UFC/mL fueron expuestas a $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 durante 30 min. Se muestra la misma micrografía en campo claro (A) y escaneo confocal láser (B-D), donde la imagen está sin procesar (B) ó mejorada la señal de fluorescencia digitalmente (C). Se indica la secuencia del mecanismo de acción del péptido (D): 1. Interacción con las envueltas celulares; 2. Localizado intracelularmente en pequeñas vescículas, 3. Localizado en una vacuola que aumenta su tamaño, 4. Extrusión de la vacuola al citosol y 5. Completa tinción del citoplasma (muerte celular).

celular (**Figura 20D4-5**). Los resultados obtenidos con la levadura son consistentes con una secuencia de interacción del péptido similar a lo encontrado en el hongo filamentoso *Neurospora* (Muñoz *et al.*, 2012).

La secuencia de aminoácidos de PAF26 consta de dos motivos diferenciados: 1) Un motivo catiónico en la posición N-terminal formado por residuos de arginina y lisina (RKK), y 2) uno hidrofóbico en la posición C-terminal, compuesto por aminoácidos aromáticos (WFW). Para estudiar la implicación de cada uno de ellos en la actividad antimicrobiana se diseñaron dos hexapéptidos derivados PAF95 y PAF96, en los cuales se sustituyeron los residuos en cada uno de los dos extremos N- y C-terminal por residuos de alanina, respectivamente. Se analizó la actividad antimicrobiana de ambos péptidos (PAF95 y PAF96), así como su interacción y localización en las células de *S. cerevisiae*. Además, y en paralelo a este estudio se analizaron las actividades inhibitorias y la localización subcelular en el hongo modelo *N. crassa* y en el patógeno fúngico *A. fumigatus*, dentro de la colaboración con el grupo de la Universidad de Edimburgo, para establecer cómo afectan dichas variaciones de secuencia a las propiedades globales de PAF26.

En primer lugar, se realizaron ensayos para comparar la actividad fungicida de PAF26 y sus dos péptidos representativos derivados (PAF95 y PAF96) a la concentración de 64 μ M sobre las células de *S. cerevisiae*, de la misma forma que se había hecho en experimentos anteriores (**Figura 17** y **Figura 18**). Como se observa en la **Figura 21A**, se pudo comprobar que las variaciones realizadas con las sustituciones de alanina en los extremos N- y C-terminal de la secuencia de aminoácidos de PAF26, claramente influyeron negativamente sobre su actividad antifúngica. En dicho experimento se pudo observar que PAF95 tuvo un aumento importante en el número de unidades formadoras de colonias obtenidas y fue por tanto menos activo comparado a PAF26. Se observó un comportamiento similar con el péptido PAF96.

Posteriormente, se evaluó la interacción y localización de dichos péptidos derivados de PAF26 marcados con TMR en su extremo N-terminal, de la misma forma descrita anteriormente. Se pudo constatar que TMR-PAF95 prácticamente no interaccionó con las células de levadura como lo demuestra la nula fluorescencia

detectada mediante microscopía confocal láser (**Figura 21C2**). Cabe resaltar que en PAF95 la carga catiónica se ha neutralizado por los residuos de alanina, y este resultado junto con otros previos del grupo (ver Discusión) indica que el carácter catiónico es determinante en la interacción inicial de los péptidos PAF con las envueltas celulares del hongo cargadas negativamente. Por otro lado, en relación al péptido TMR-PAF96 (**Figura 21D2**), se pudo observar que la señal roja de fluorescencia permanece solamente en las envueltas celulares similar a lo detectado en los hongos *N. crassa* y *A. fumigatus* (ver Discusión). Estos resultados confirman que ambos motivos son necesarios para la completa actividad antifúngica del hexapéptido PAF26, siendo el dominio hidrofóbico necesario para la internalización celular.

1.4. Estudio comparado de la interacción y localización de PAF26 sobre distintos mutantes en *S. cerevisiae*

Como se ha detallado en el Apartado 1.1 de Resultados, se habían identificado mutantes de *S. cerevisiae* que mostraron sensibilidad alterada frente a PAF26. Entre ellos se encuentran mutantes de delección de: 1) Genes que participan en el ciclo de urea y metabolismo de arginina (incluyendo *ARG1*); 2) *IPT1* implicado en la biosíntesis de un esfingolípido específico de membrana; 3) *ECM33*, que codifica para una proteína GPI-anclada a la pared celular de función desconocida; y por último, 4) genes que participan en la N- y O-glicosilación de proteínas, principalmente *EOS1* y *PMT2*. En este apartado, se decidió analizar por microscopía confocal láser si estas diferencias en la sensibilidad frente a PAF26 están correlacionadas con modificaciones en la localización del péptido marcado en las células de levadura, y en comparación a la interacción previamente caracterizada de la cepa parental BY4741 observada en el apartado anterior. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron fotos representativas (**Figura 22** y **Figura 23**).

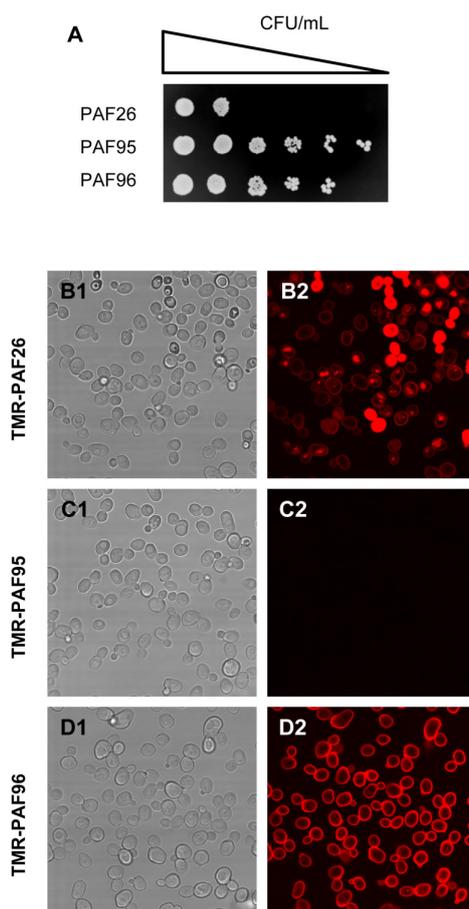


Figura 21. Actividad y localización de péptidos derivados de PAF26 frente a *S. cerevisiae* BY4741.

A) Actividad fungicida. Las células fueron expuestas a 64 μM de PAF26, PAF95 y PAF96 durante 24 h, y 5 μL de diluciones seriadas de las mismas se aplicaron sobre placas de YPD (sin péptido).

B-D) Localización de los distintos PAFs marcados con fluorescencia mediante microscopía confocal láser. Las células 1×10^6 UFC/mL fueron expuestas a 2,5 μM de cada TMR-PAFs durante 1 h. Se muestran micrografías representativas de la interacción con (B) TMR-PAF26, (C) TMR-PAF95 y (D) TMR-PAF96 en campo claro (1) y escaneo confocal láser (2).

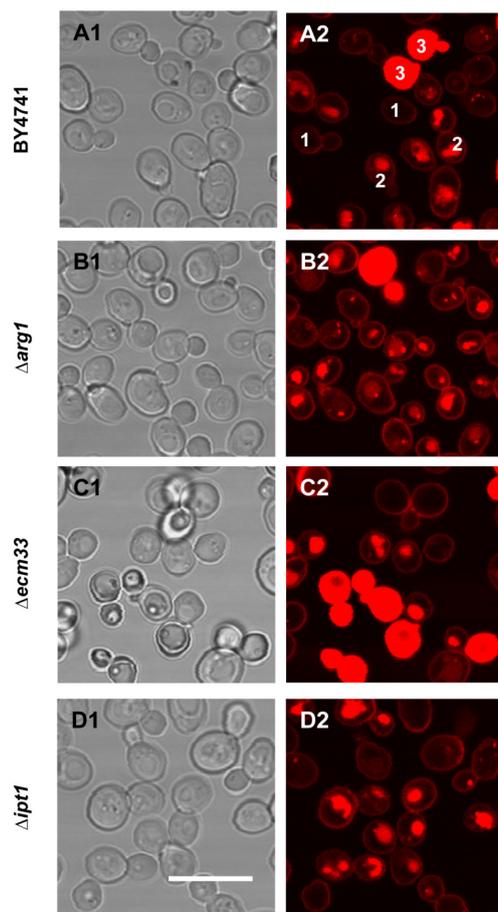


Figura 22. Localización diferencial del péptido TMR-PAF26 en cepas deletantes de *S. cerevisiae* mediante microscopía confocal láser.

Las células 1×10^6 UFC/mL fueron expuestas a $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 durante 30 min. Se muestra micrografías representativas de (A) BY4741, (B) $\Delta arg1$, (C) $\Delta ecm33$, (D) $\Delta ipt1$ en campo claro (1) y escaneo confocal láser (2). Barra: $10 \mu\text{m}$. En A2 se indican las tres categorías (1, 2, y 3) de interacción de TMR-PAF26 (ver el texto para más detalles).

Además, se realizaron recuentos de las células que exhibieron fluorescencia y fueron separadas en tres categorías correspondientes cada una a la localización diferencial del péptido TMR-PAF26 en las mismas (**Figura 23**). Como se observa en la **Figura 22A2** y **Figura 23**, en la cepa parental BY4741 prácticamente la totalidad de las células mostró señal de fluorescencia y se distinguieron estos tres patrones de localización de TMR-PAF26: el 15-25 % de células que presentaron señal de fluorescencia localizada sólo en la envoltura celular (1); el 60-75 % mostraron fluorescencia en estructuras intracelulares (2), y el 5-20 % exhibieron señal roja intensa extendida en toda la célula que fue coincidente con la muerte celular (3) (**Figura 23**).

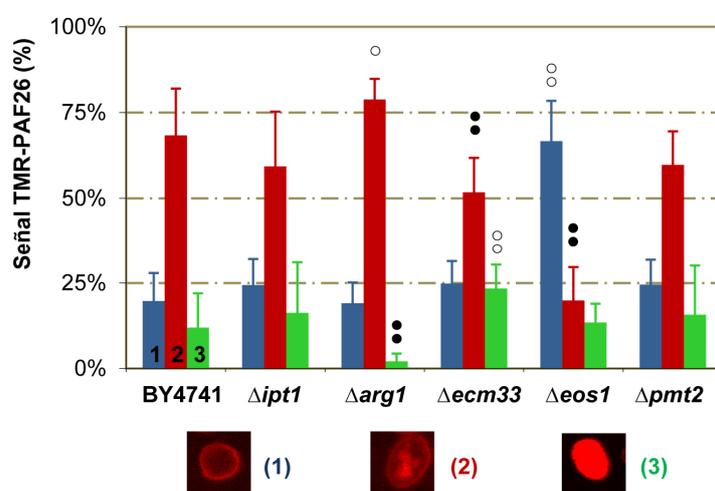


Figura 23. Análisis de la localización diferencial de TMR-PAF26 en cepas deletantes seleccionadas de *S. cerevisiae*.

Los datos representan los valores medios \pm SD de los porcentajes obtenidos del número de células asignadas para las categorías 1, 2 y 3 descritas en el texto y ejemplificadas en la parte inferior de la figura de tres experimentos independientes (3 repeticiones). Los círculos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa parental BY4741, representando los valores más bajos con color negro y los más elevados con blanco. Un círculo corresponde a $p < 0,05$ y dos círculos $p < 0,01$.

La interacción de TMR-PAF26 con las cepas mutantes $\Delta arg1$ y $\Delta ecm33$ presentó diferencias que no fueron importantes pero sí cuantitativamente significativas en la localización de la señal de fluorescencia comparada con BY4741 (**Figura 22**). La fluorescencia detectada en el mutante $\Delta arg1$ estuvo principalmente localizada en orgánulos intracelulares tipo vacuolas (**Figura 23**, categoría 2), que además y en general presentaban un tamaño menor que en el caso de las demás cepas. El porcentaje de células con señal total de fluorescencia en el citoplasma fue menor en concordancia con su fenotipo de resistencia a PAF26. El uso de la sonda vacuolar cFDDFA permitió constatar la co-localización de la señal de la categoría 2 en los orgánulos vacuolares tanto en la cepa parental BY4741 como $\Delta arg1$ (**Figura 24**), confirmando la localización intracelular vacuolar en *S. cerevisiae*, similar a lo encontrado en el hongo *N. crassa* (Muñoz *et al.*, 2012). Sin embargo, las observaciones de la localización vacuolar en el mutante $\Delta arg1$ de levadura no fueron tan consistentes como lo demostrado con el péptido sólo, ya

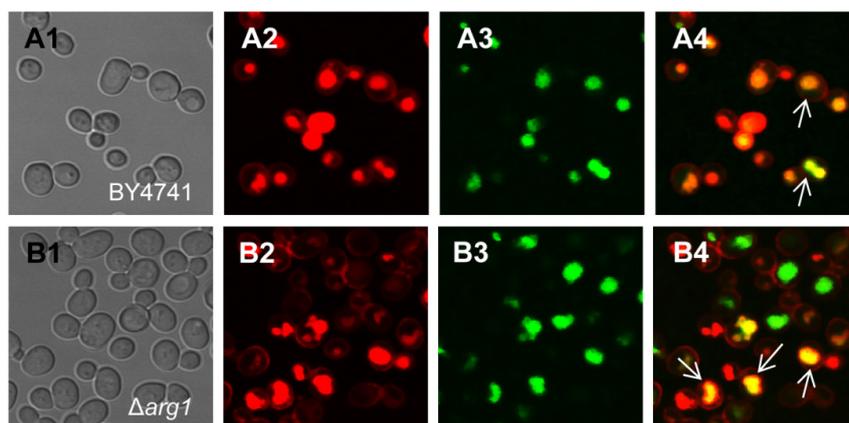
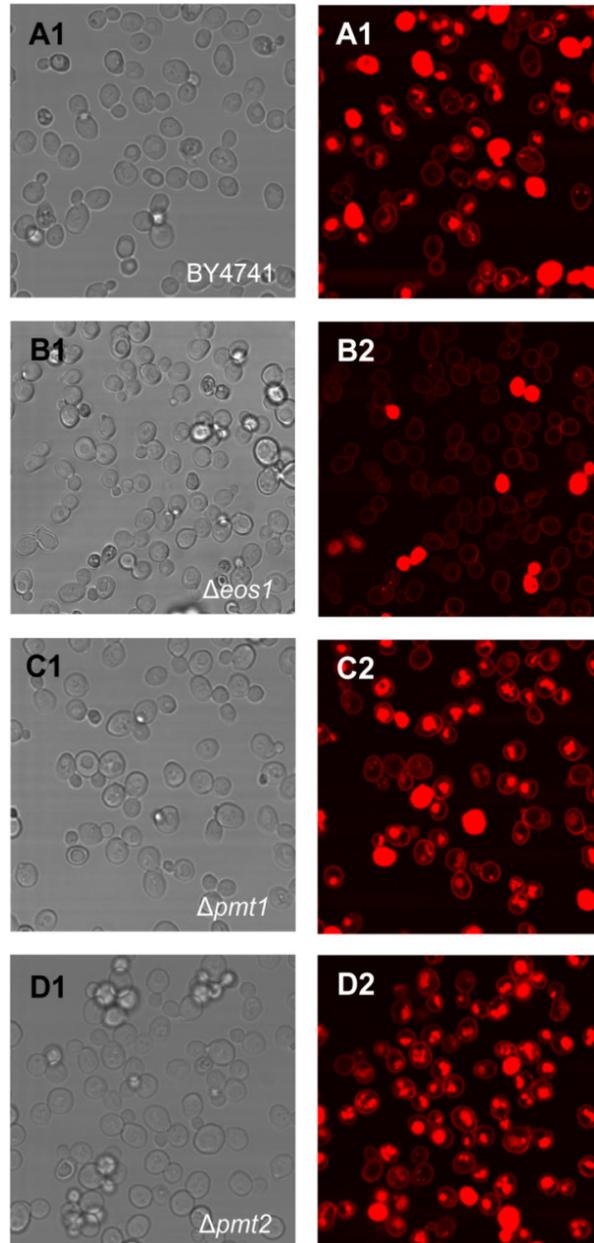


Figura 24. Visualización de la localización en vacuolas del péptido TMR-PAF26 y la sonda cFDDFA en *S. cerevisiae* BY4741 mediante microscopía confocal láser. Las células 1×10^6 UFC/mL fueron expuestas a la sonda vacuolar cFDDFA $20 \mu\text{M}$ durante 30 min, a 30°C . Luego fueron tratadas con $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 durante 1 h. Se muestran las mismas micrografías para (A) BY4741 y (B) $\Delta arg1$ en campo claro (A1, B1) y escaneo confocal láser con la fluorescencia roja para TMR-PAF26 (A2; B2), verde para cFDDFA (A3, B3) y la superposición de ambas imágenes (A4, B4). Las flechas indican la co-localización en vacuolas.

que existió una especie de competencia con la sonda vacuolar usada.

En el caso de la cepa $\Delta ec m 33$ se registró un mayor número de células con tinción completa del citoplasma en dicho mutante (23%; **Figura 23**) que en la cepa parental. Esto se correlaciona con la mayor sensibilidad mencionada previamente de $\Delta ec m 33$ frente a PAF26. Los tres patrones de distribución de TMR-PAF26 dentro de las células del mutante $\Delta ipt 1$ fueron similares a lo detectado en la cepa BY4741 (**Figura 22D2**) y esto fue confirmado con los recuentos realizados, en los que no se detectaron diferencias significativas (**Figura 23**).

También en este estudio hemos realizado la caracterización de la interacción de TMR-PAF26 en aquellos mutantes pertenecientes a genes que participan en el proceso de glicosilación. En los mutantes pertenecientes a la familia PMT de las manosiltransferasas de proteínas se pudo constatar que no existen variaciones en su localización subcelular con respecto a la cepa parental (**Figura 25**). Incluso en el mutante $\Delta pmt 2$ (**Figura 25D2**) cuyo fenotipo fue marcadamente resistente en los ensayos de actividad fungicida, no se observaron diferencias significativas en la visualización microscópica y ni siquiera en los recuentos para los distintos patrones de localización, como lo demuestran los valores porcentuales obtenidos dentro de las categorías ya asignadas con respecto a BY4741 (**Figura 23**).



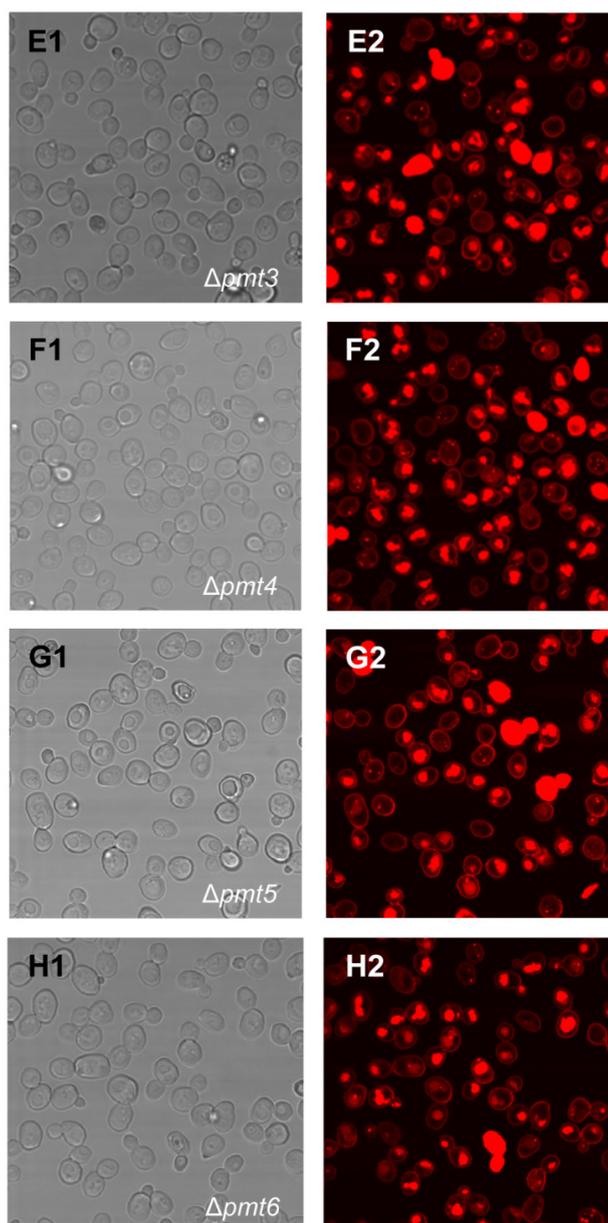


Figura 25. Localización del péptido TMR-PAF26 en cepas deletantes en genes *PMT* de *S. cerevisiae* con microscopía confocal láser.

Las células 1×10^6 UFC/mL fueron expuestas a $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 durante 30 min. Se muestran micrografías representativas de (A) BY4741, (B) Δeos1 , (C) Δpmt1 , (D) Δpmt2 , (E) Δpmt3 , (F) Δpmt4 , (G) Δpmt5 , (H) Δpmt6 en campo claro (1) y escaneo confocal láser (2).

Eos1p se ha propuesto que participa en el proceso de N-glicosilación en *S. cerevisiae* (Nakamura *et al.*, 2007) (ver también Discusión). La interacción del péptido TMR-PAF26 con las células del mutante $\Delta eos1$ presentó diferencias cualitativamente muy relevantes, ya que se observó que la señal de fluorescencia permanecía únicamente en sus envueltas celulares (**Figura 25B2**). Esta localización diferencial en las células del mutante $\Delta eos1$ fue comprobada con los recuentos realizados (**Figura 23**), en donde el mayor porcentaje de células del péptido marcado con fluorescencia se asignó en la categoría de las envueltas celulares, dando un valor de 67 %, más de tres veces superior al marcaje detectado en dicha categoría para las células de BY4741 (19 %). Este resultado sugiere que la envoltura celular es crítica para la interacción e internalización del péptido y que *EOS1* ejerce su actividad a través de la glicosilación de proteínas de la pared celular que son requeridas para la internalización de PAF26 (ver Discusión).

Además, se realizaron experimentos para evaluar la interacción y localización de los péptidos PAF95 y PAF96 derivados de PAF26, de forma similar a lo realizado con BY4741 (apartado 1.3 de Resultados). En relación a ello, no se observaron diferencias en la localización de TMR-PAF95 y TMR-PAF96 en ninguno de los mutantes analizados con respecto a lo previamente caracterizado en las células de la cepa parental BY4741 (datos no mostrados).

1.5. Implicación de la pared celular en la interacción con el péptido PAF26 y la susceptibilidad al mismo en la cepa parental *S. cerevisiae* y su mutante $\Delta eos1$

En base a estos resultados con el mutante $\Delta eos1$, decidimos explorar el papel que cumple la pared celular no solamente para la interacción con el péptido PAF26, sino también para su internalización en las células de levaduras. Para ello, en primer lugar se obtuvieron protoplastos de ambas cepas (BY4741 y $\Delta eos1$) siguiendo el protocolo modificado de (Petit *et al.*, 1994) y colaboradores (ver apartado 6.1 de Materiales y Métodos), y usando el complejo enzimático comercial glucanex (2 mg/mL). Se partió de una densidad de 1×10^8 células/mL para cada

cepa y una vez obtenidos sus protoplastos se trataron con $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 e incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Además, en paralelo se trabajó con células con pared que fueron sometidas a los mismos lavados e incubaciones pero sin el tratamiento enzimático, y expuestas también a $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26.

Cabría esperar que aquellos péptidos antimicrobianos cuyo mecanismo de acción se basa en la permeabilización de membranas interaccionaran más fácilmente con las membranas de células desprovistas de la pared celular y resultaran mucho más activos. En el caso de PAF26, ocurrió todo lo contrario ya que, en primer lugar, cuando los protoplastos de la cepa parental BY4741 fueron expuestos al péptido marcado, interaccionaron débilmente con él y no fueron capaces de internalizarlo (**Figura 26C2**). Mimetizando incluso la localización de fluorescencia de TMR-PAF26 en las células enteras del mutante $\Delta eos1$ (**Figura 26B2**). Esto claramente permitió concluir que la pared celular resulta necesaria para la interacción e internalización del péptido PAF26.

Cuando se realizó la caracterización de la interacción del péptido TMR-

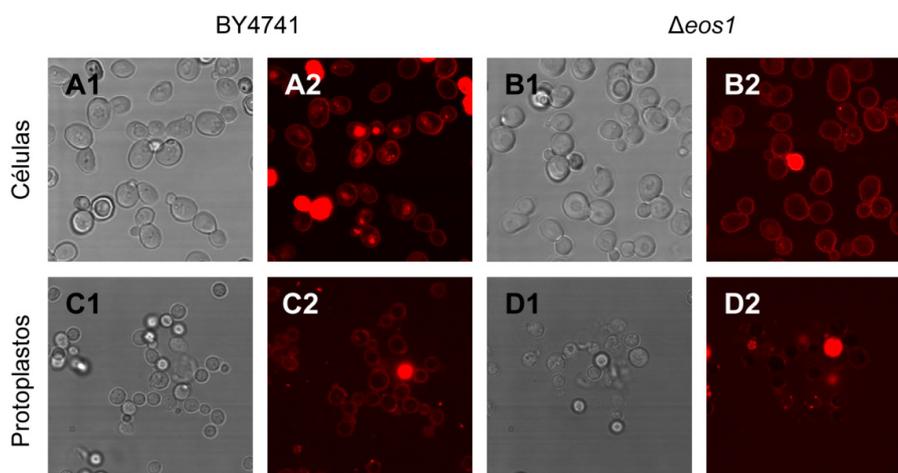


Figura 26. Localización del péptido TMR-PAF26 en células enteras y protoplastos de *S. cerevisiae* con microscopía confocal láser.

Las células enteras (1×10^6 UFC/mL) y los protoplastos (1×10^8 UFC/mL) de BY4741 (A, C) y $\Delta eos1$ (B, D), fueron incubados con $2,5 \mu\text{M}$ de TMR-PAF26 durante 1 h. Se muestran las mismas micrografías en campo claro (1) y escaneo confocal láser (2).

PAF26 en los protoplastos obtenidos de la cepa mutante $\Delta eos1$ se pudo observar que la intensidad de fluorescencia fue más baja que la detectada cuando fueron usadas sus células enteras (**Figura 26D2**). Aunque la distribución y localización subcelular de dicha señal no fue significativamente diferente a los protoplastos de BY4741 (**Figura 26C2**) y las células enteras de $\Delta eos1$ (**Figura 26B2**), a diferencia de lo que ocurre con BY4741. Se compararon los resultados obtenidos de la cuantificación de fluorescencia de los experimentos llevados a cabo tanto con protoplastos como con células enteras. Como se muestra en la **Figura 27**, se pudo confirmar cuantitativamente un cambio en la distribución de la señal de fluorescencia del péptido PAF26 en los protoplastos de BY4741, para los que claramente se observan: 1) Un aumento en el porcentaje de células con fluorescencia predominante en la membrana celular, y 2) una reducción en el número de células con fluorescencia localizada en vacuolas y citoplasma. Estos resultados indican una menor internalización de PAF26 en las células de levaduras cuando son desprovistas de pared celular. Además, no existieron variaciones en los porcentajes obtenidos para cada una de las categorías asignadas en los

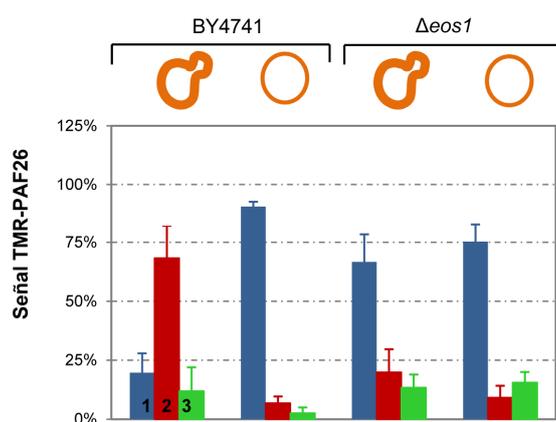


Figura 27. Análisis comparativo de la localización diferencial de TMR-PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de *S. cerevisiae*.

Los datos representan los valores medios \pm SD de los porcentajes obtenidos del número de células asignadas para cada una de las tres categorías similar a lo realizado en la Figura 23 de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

protoplastos *Δeos1* al compararlos con lo detectado en las células enteras.

Se decidió comprobar si el bloqueo de la internalización del péptido provocado por la eliminación de la pared celular da como resultado una menor sensibilidad frente a PAF26. Los ensayos de muerte celular que hemos venido realizando (esto es, de tratamiento con el péptido y posterior crecimiento en placas sin péptido) no pueden ser realizados con protoplastos. Por ello, pusimos a punto un ensayo basado en la tinción con el marcador de muerte celular yoduro de propidio (PI). Se realizaron unos ensayos comparativos de viabilidad celular (**Figura 28**), en donde las células enteras y los protoplastos de cada cepa (BY4741 y *Δeos1*) se trataron con 2,5 μM PAF26 (péptido sin marcar) durante 1 h. Estas muestras luego se sometieron al tratamiento con 2 μg/mL de PI. En las fotos representativas de dichos ensayos realizados se pudo comprobar cómo la intensidad de la señal roja de fluorescencia producida por el PI fue muy reducida en los protoplastos de ambas cepas tratados con PAF26 (**Figura 28C2-D2**) confirmando que la muerte celular es menor al eliminar la pared.

Al analizar cuantitativamente la tinción con PI en las muestras analizadas correspondientes a cada cepa, se pudo confirmar que las células enteras de *Δeos1* exhibieron porcentajes más bajos de tinción (muerte celular) al compararlo con la cepa parental (BY4741) (**Figura 29**). Estas diferencias porcentuales de muerte celular fueron significativas ($p < 0.001$) entre ambas cepas y estuvieron correlacionadas con el fenotipo resistente de *Δeos1* ya caracterizado previamente.

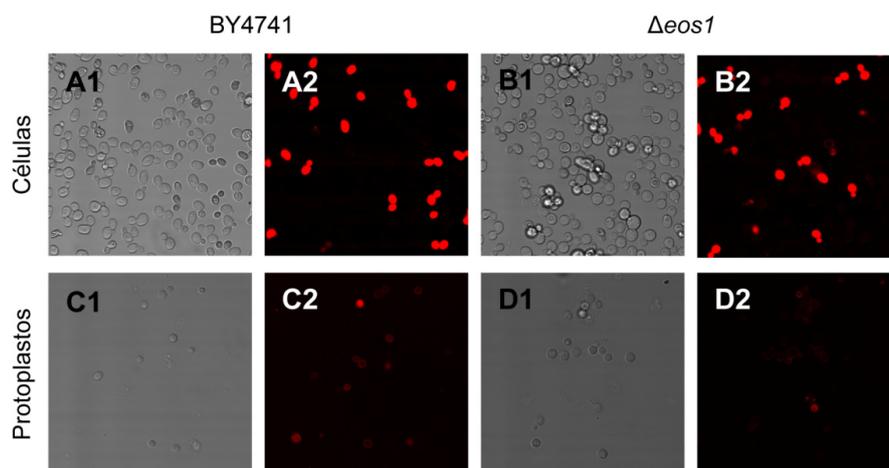


Figura 28. Visualización de la muerte celular causada por el péptido PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de *S. cerevisiae* con microscopía confocal láser.

Las células (1×10^6 UFC/mL) y los protoplastos (1×10^8 UFC/mL) fueron tratados con $2,5 \mu\text{M}$ de PAF26 durante 1 h y posteriormente teñidos con yoduro de propidio ($2 \mu\text{g/mL}$). Se muestran las mismas micrografías para BY4741 (A-C) y $\Delta eos1$ (B-D) en campo claro (1) y escaneo confocal láser (2).

Por otro lado, los protoplastos de ambas cepas exhibieron porcentajes similares de muerte celular que no fueron estadísticamente significativos entre sí ($p=0.347$) y fueron más bajos que aquellos valores registrados con células enteras. Todos estos resultados en su conjunto apoyan la hipótesis de que la pared celular es imprescindible para la interacción e internalización del péptido PAF26, y además resaltan la importancia de la misma para que el péptido penetre dentro de la célula de *S. cerevisiae* y desencadene la muerte celular, ejerciendo su actividad antifúngica. Además, indican que el fenotipo de $\Delta eos1$ se debe a una pérdida de función relacionada con pared celular.

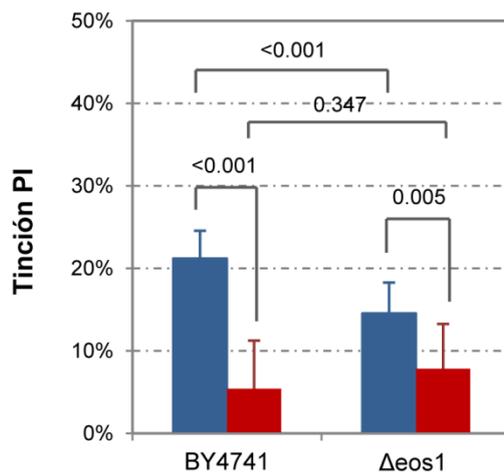


Figura 29. Análisis comparativo de la acción fungicida de PAF26 en células enteras y protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$ de *S. cerevisiae*.

Los datos representan los valores medios \pm SD de los porcentajes obtenidos del número de células muertas determinado por la tinción con yoduro de propidio en dos experimentos independientes con tres repeticiones. Las barras azules muestran los datos con células enteras y las rojas con protoplastos. Se indica la significación estadística (valor p) de las distintas comparaciones.

2. Identificación y caracterización de la expresión génica de la familia de genes *PMT* en *Penicillium digitatum*

Teniendo en cuenta los resultados precedentes, en el siguiente objetivo nos planteamos la identificación de los miembros de la familia génica *PMT* en el hongo *P. digitatum*. Para ello fue necesaria la obtención de una biblioteca de DNA genómico que permitiera el aislamiento de los genes completos. Posteriormente se hizo la caracterización de su expresión génica durante el crecimiento del hongo, su exposición al hexapéptido PAF26, y el proceso de infección de frutos cítricos.

2.1. Identificación de tres fragmentos parciales de los posibles genes *PMT* en *P. digitatum*

Para la identificación de secuencias específicas de genes *PMT* se diseñó una estrategia basada en la amplificación del DNA genómico mediante PCR utilizando oligonucleótidos degenerados. Para ello, en primer lugar se realizó una búsqueda en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y del Broad Institute (www.broadinstitute.org) para identificar las secuencias de nucleótidos de los genes *PMT* que estén presentes en los genomas disponibles de los hongos *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *M. grisea* y *B. cinerea* (ver más adelante **Figura 41**). En general, se utilizó el programa BLAST para buscar secuencias que resultaran homólogas a cada uno de los genes *PMT* ya descritas en la levadura modelo *S. cerevisiae*.

Posteriormente, se generó un alineamiento múltiple de las secuencias encontradas utilizando los programas CLUSTAL w2 y DNAMAN. En la **Tabla 15** se muestran los seis oligonucleótidos degenerados que fueron diseñados a partir de las zonas altamente conservadas de los genes *PMT* en las diferentes especies de hongos Ascomycota analizadas.

Mediante amplificación por PCR se obtuvieron tres bandas mayoritarias del tamaño esperado y otras minoritarias para cada una de las tres combinaciones de

Tabla 15. Pareja de oligonucleótidos degenerados diseñados y usados para aislar los fragmentos parciales de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Cebadores | 5` - 3` | Uso | Gen |
|-----------|-----------------------|-----|-------------|
| OJM78 | TGGGAYGARGCNCACCTTYGG | F | <i>PMT2</i> |
| OJM79 | CTCATCTGVGCATCDDCCNGG | R | <i>PMT2</i> |
| OJM80 | TTCTTYGAYGTNCACCCTCC | F | <i>PMT4</i> |
| OJM82 | TGGAHTCVGGNGTCATGAA | R | <i>PMT4</i> |
| OJM89 | CACGTCATGACTGGCTGTGT | F | <i>PMT1</i> |
| OJM90 | GCCATAAGGTAGAAKGGGAAG | R | <i>PMT1</i> |

Código de letras: M: C,A; N: A,T,G o C; V: A,C,G; R: A o G; Y: C o T, H:A,C,T, K: G,T.

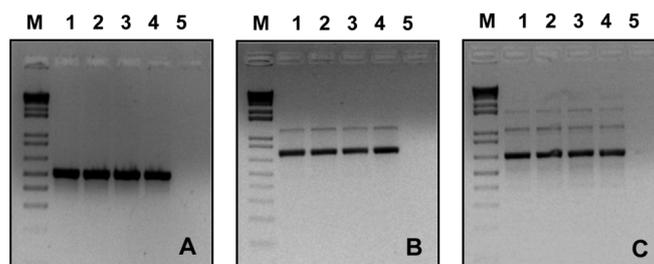


Figura 30. Amplificación por PCR de fragmentos parciales de genes *PMT* en *P. digitatum*.

Se muestran los productos amplificados con los oligonucleótidos OJM89/OJM90 (A), OJM78/OJM79 (B), OJM80/OJM82 (C), respectivamente. Gel de agarosa 0,8 % en tampón TAE 1x. M: Marcador de peso molecular 1 kb DNA, 1-4: cuatro réplicas del DNA genómico (gDNA) del hongo usado como molde (200 ng) y 5: control negativo.

pares de oligonucleótidos. En la **Figura 30**, se puede observar la electroforesis en gel de agarosa con los fragmentos amplificados con las parejas de oligonucleótidos OJM89/OJM90, OJM78/OJM79 y OJM80/OJM82 con un tamaño aproximado de 597, 698 y 673 pb, respectivamente, usando como molde el DNA genómico de *P. digitatum*.

Los productos de PCR amplificados fueron purificados y clonados en el vector pGEM-T. Entre cuatro y doce colonias transformantes fueron elegidas al azar como representantes de cada uno de los tres productos de PCR (**Tabla 16**) y sus insertos fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron sometidas a una búsqueda BLAST (Blastn) en la base de datos del NCBI para encontrar homologías con las secuencias depositadas y confirmar su anotación funcional. Los resultados que se encuentran detallados en la **Tabla 16** muestran que cada uno de los tres fragmentos de DNA aislados de *P. digitatum* correspondieron a un miembro de cada subfamilia PMT, siendo nombrados cada gen individual como *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4*, respectivamente. Estas tres secuencias parciales de cada gen *PMT* de *P. digitatum* presentaron un elevado porcentaje de identidad (92, 90 y 91 %, respectivamente) con las secuencias ortólogas identificadas en el genoma de *P. chrysogenum*.

Tabla 16. Análisis de homología de los tres amplicones obtenidos con los oligonucleótidos degenerados de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Genes <i>P. digitatum</i> | Cebadores F/R | Clones positivos | Tamaño (pb) | E- valor (% de Identidad) | Análisis BLAST |
|------------------------------|------------------|---------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <i>PMT1</i> | OJM89/ OJM90 | 4 | 597 | 0 (92 %) | <i>P. chrysogenum</i> Pc20g07670 |
| <i>PMT2</i> | OJM78/ OJM79 | 4 | 698 | 0 (90 %) | <i>P. chrysogenum</i> Pc12g05130 |
| <i>PMT4</i> | OJM80/ OJM82 | 1 | 673 | 0 (91 %) | <i>P. chrysogenum</i> Pc21g05160 |

2.2. Construcción y caracterización de la biblioteca genómica de *P. digitatum*

La obtención de la biblioteca genómica de *P. digitatum* se hizo mediante el uso del "Copy Control Fosmid Library Production Kit" (Epicentre Biotechnologies) (ver detalles en el apartado 12 de Materiales y Métodos). En la **Figura 31A** se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa la calidad del DNA genómico extraído del micelio del hongo, y que también se constató mediante espectrofotometría (datos no mostrados). La cuantificación de la muestra de DNA extraída fue realizada con el fluoróforo "Picogreen" (Invitrogen) y permitió determinar que se obtuvieron aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA. El protocolo de extracción utilizado (Moller *et al.*, 1992) sirvió para obtener una buena preparación de DNA genómico, en cantidad y calidad suficientes para ser usado directamente en la obtención de la biblioteca genómica y que posteriormente también serviría como molde para la secuenciación del genoma de la cepa PHI26 de *P. digitatum* (CECT20796) (Marcet-Houben *et al.*, 2012).

Una electroforesis CHEF bajo campo pulsante (**Figura 31B**), permitió comprobar que el DNA obtenido se encuentra fragmentado en fragmentos que oscilan entre 30 y 50 kb. Esto último es de suma importancia para la construcción de la biblioteca, ya que el DNA genómico a utilizar debe estar fragmentado en tamaños de 40 kb. Es por ello, que en este caso no se necesitó realizar cortes al azar adicionales y se procedió directamente a recuperar y purificar del gel de

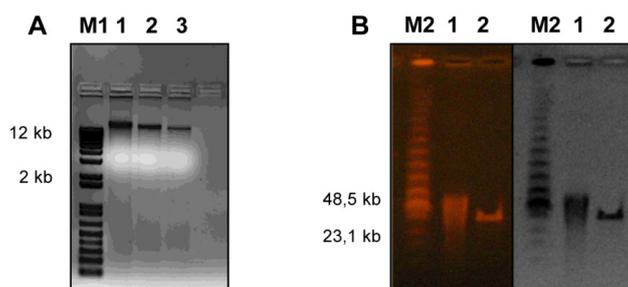


Figura 31. Electroforesis normal (A) y bajo campo pulsante (B) del DNA genómico de *P. digitatum*.

A) Líneas 1-3: diluciones seriadas 1/10 del gDNA del hongo y M1: marcador de peso molecular 1 kb DNA. Gel de agarosa 0,7 % en tampón TAE 1x. B) Línea 1: gDNA de hongo, línea 2: DNA control del fósido (36 kb), y M2: Marcador Lambda (PFG). Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en tampón TBE 0,5x a 14 °C y 6 V/cm.

agarosa de bajo punto de fusión la zona de DNA próximas a los 36 kb que se correspondieron con el tamaño de la muestra control de fósido.

Una vez purificado el DNA, se decidió trabajar con dos concentraciones del mismo para la obtención de la biblioteca, 250 ng (que es la concentración recomendada) y 480 ng, en las reacciones de ligación para comprobar si existían variaciones en el número de colonias recombinantes obtenidas. Estos DNA se ligaron en el vector pCC2FOS y empaquetaron en los extractos de Max Plax Lambda. Este material empaquetado se infectó sobre *Escherichia coli* EPI300-T1 y se sembró una alícuota de 5 μ L en placas con medio de selección (LB + cloranfenicol) para determinar la titulación de las colonias obtenidas (**Figura 32**). Se obtuvo una mayor eficiencia de transformación al utilizar 480 ng de DNA genómico (**Figura 32B**), registrando un total de $7,0 \times 10^4$ UFC/mL de recombinantes, que representó un 40 % superior a la muestra de 250 ng ($4,7 \times 10^4$ UFC/mL). Además, la cepa *E. coli* EPI300-T1 (sin DNA) no creció en placas de LB + cloranfenicol, y se obtuvo un típico césped bacteriano cuando se sembró en placas de medio LB. En el caso del control positivo del fósido empaquetado, se obtuvieron $2,7 \times 10^5$ UFC/mL, un orden de magnitud superior. En

función de estos resultados, decidimos continuar con los pasos del protocolo usando la biblioteca genómica correspondiente a los 480 ng de DNA.

Inicialmente, postulamos el tamaño del genoma de *P. digitatum* en aproximadamente 40 Mb, en función del tamaño de los genomas descritos en otros hongos filamentosos relacionados como *P. chrysogenum* (32 Mb) (van den Berg *et al.*, 2008), o el fitopatógeno *Fusarium verticilloides* (42 Mb) (Brown *et al.*, 2005). Teóricamente, la probabilidad de contener un gen dado en una biblioteca genómica se calcula según la fórmula proporcionada por (Sambrook *et al.*, 1989) y detallada en el apartado 12.4 de Materiales y Métodos. Por ello, conservamos un total de 9000 clones de fósidos para garantizar una representatividad de al menos el 99,9 %.

Esta biblioteca de 9000 clones ha sido repartida en mezclas de aproximadamente 150 fósidos cada una y organizada en un total de 60 tubos glicerizados y guardados a -80 °C. Es importante recalcar que los fósidos introducidos en las cepas bacterianas *E. coli* EPI300-T1 están en copia única debido a que el gen *TrfA* se encuentra reprimido bajo las condiciones dadas por el

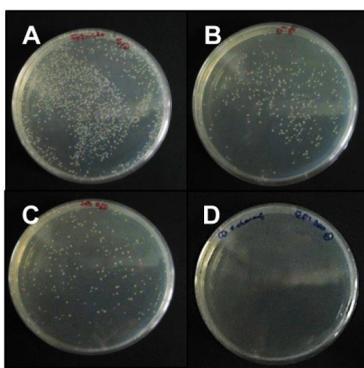


Figura 32. Colonias de bacterias *E. coli* (EPI300-T1) conteniendo los fósidos empaquetados.

A) Control fósido, B) Fósidos obtenidos con 480 ng de gDNA del hongo, C) Fósidos obtenidos con 250 ng de gDNA fúngico, y D) Control negativo. Las placas contienen medio sólido LB + cloranfenicol 12,5 µg/mL para la selección de las bacterias infectadas.

medio LB + cloranfenicol. Los fósmidos deben ser amplificados para obtener un gran número de copias (solución de inducción provista por el kit Epicentre Biotechnologies) como un paso previo para la purificación de los mismos y digestión con endonucleasas o amplificación por PCR.

Para comprobar el tamaño de los insertos de DNA fúngico presentes en los fósmidos de la biblioteca genómica, se seleccionaron seis fósmidos individuales al azar, se crecieron en medio de inducción, se purificaron por lisis alcalina y columna, y finalmente se analizaron por restricción. En la **Figura 33A-B** se observan las muestras del DNA purificado y digerido con la enzima *Bam*HI para cada uno de los seis fósmidos inducidos, respectivamente. La enzima de restricción *Bam*HI tiene dos sitios de corte que delimita la zona de inserción del DNA en el vector pCC2FOS. Los resultados obtenidos con las muestras digeridas muestran que todos los clones presentan la banda de 8 kb correspondiente al vector fósido pCC2FOS. Además, se logró comprobar que el tamaño de los seis insertos ligados al vector oscilan entre 21,5 y 37,5 kb, con un promedio de 30 kb.

Recientemente, se ha secuenciado el genoma de nuestra cepa de *P. digitatum* PHI26 (Marcet-Houben *et al.*, 2012) demostrándose que su tamaño es del orden de unos 26 Mb, registrando una reducción en el tamaño al compararlo con el tamaño presupuesto (40 Mb) y descrito en especies relacionadas del género *Penicillium*. Por tanto, con el tamaño real del genoma y con el promedio de tamaño de inserto de la biblioteca genómica, la probabilidad de que un fragmento cualquiera del genoma de *P. digitatum* no se encuentre en los 9000 fósidos de la biblioteca es menor que 0,003 %.

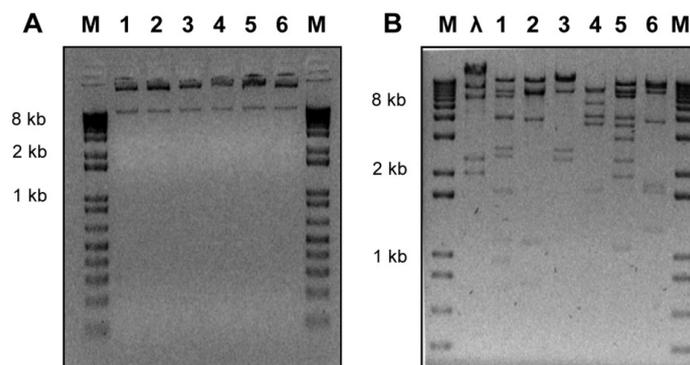


Figura 33. Electroforesis del DNA purificado de seis fósmidos inducidos (A) y digeridos con *Bam*HI (B).

Líneas 1-6: Fósmidos purificados de las colonias bacterianas EPI300-T1 infectadas. M: Marcador de peso molecular 1 kb DNA. λ : Lambda DNA digerido con *Eco*RI/*Hind*III. Gel de agarosa 0,7 % en tampón TAE 1x.

Finalmente, en la **Figura 34** se representa el esquema del procedimiento que se siguió para detectar los fósmidos positivos de los genes de interés (ver apartado siguiente) mediante una estrategia basada en ciclos sucesivos de aislamiento de DNA de mezclas de fósmidos, amplificación por PCR para identificación de positivos, y dilución de cada mezcla para identificar clones individuales. El primer ciclo es universal y disponemos de 60 preparaciones de mezclas de DNA de los fósmidos representando cada mezcla inicial de ~ 150 clones independientes. Siguiendo esta estrategia descrita, cabe resaltar que nuestro grupo ha usado esta biblioteca genómica para aislar los genes involucrados en la síntesis de quitina de este hongo postcosecha (Gandía *et al.*, 2012). Más adelante se muestra un ejemplo de este procedimiento con la identificación de un fósido positivo para el gen *PdigPMT2* de *P. digitatum*.

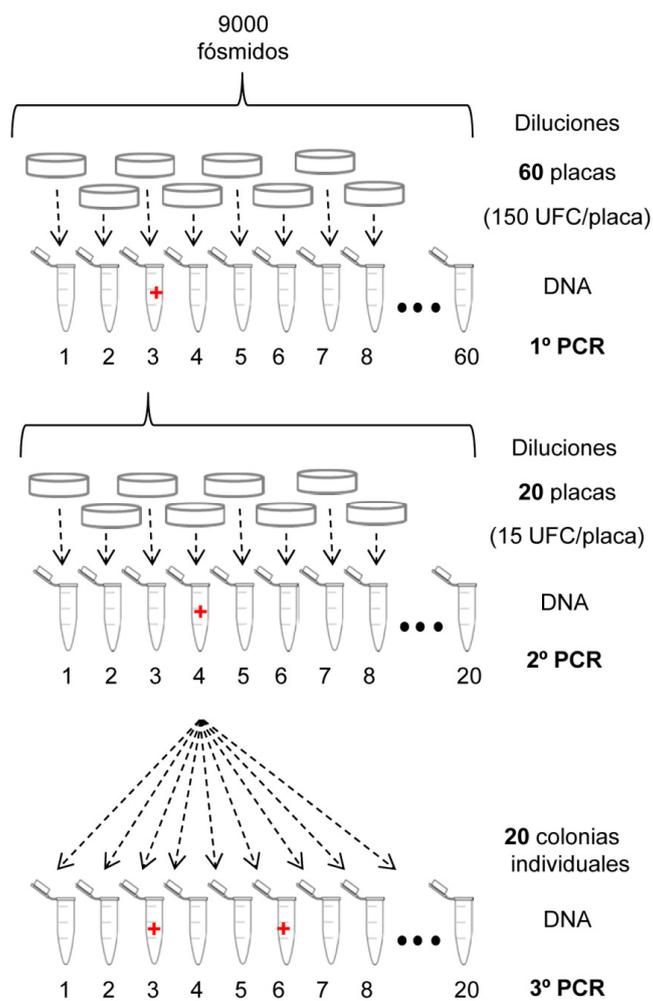


Figura 34. Representación esquemática de la búsqueda por PCR de fósmidos positivos.

2.3. Aislamiento de los genes *PMT* en la biblioteca genómica de *P. digitatum*

Para aislar los tres genes *PMT* identificados en *P. digitatum* se realizó un rastreo por PCR sobre los fósmidos de la biblioteca genómica obtenida. Se utilizaron parejas de cebadores específicos para cada gen *PMT* diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos parciales de DNA de *P. digitatum* (**Tabla 7** de Materiales y Métodos). Para poder identificar fósmidos positivos que contengan cada gen *PMT* se realizó una búsqueda con tres ciclos sucesivos de PCR siguiendo la estrategia descrita en el apartado anterior. En la **Figura 35** se muestra la electroforesis de la PCR final (3º ciclo) que permitió amplificar un fragmento de 133 pb del gen *PdigPMT2* con los oligonucleótidos específicos OJM91/OJM92. En la **Tabla 17**, se resume el procedimiento seguido para los tres genes, que permitió aislar aquellos fósmidos individuales portadores de cada gen completo *PMT* de *P. digitatum* y que fueron nombrados como pFOSPdigPMT1_05.11.15, pFOSPdigPMT2_27.13.42, y pFOSPdigPMT4_06.09.02.

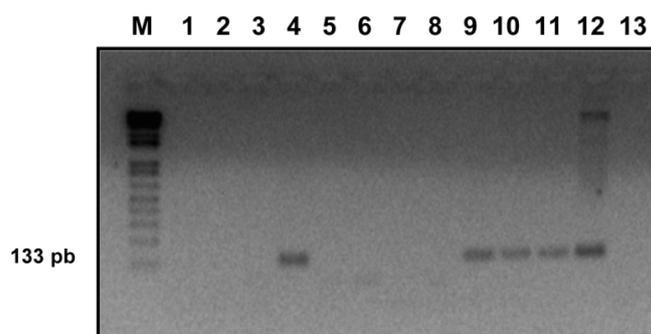


Figura 35. Identificación del fósforo individual que contiene *PdigPMT2*.

Se muestra el producto amplificado por PCR con los oligonucleótidos específicos OJM91/OJM92. M: Marcador de peso molecular 1 kb DNA, líneas 1-8: gDNA de ocho fósmidos independientes, nótese el fósforo positivo (línea 4) que tiene el amplicón esperado, línea 9: mezcla de DNA de 150 fósmidos identificado por PCR en el 1º ciclo, línea 10: mezcla de DNA de 15 fósmidos identificado por PCR en el 2º ciclo; 11: gDNA del hongo (50 ng), línea 12: clon positivo pGEM_Pmt2_EH2 y línea 13: control negativo. Gel de agarosa 0,8 % en tampón TAE 1x.

Tabla 17. Identificación de los fósmidos individuales para los genes *PMT* de *P. digitatum* por PCR con oligonucleótidos específicos.

| Genes | Cebadores específicos (F/R) | Ciclo 1 150 fósmidos | Ciclo 2 15 fósmidos | Ciclo 3 fósmino individual | Fósmino identificado que contiene <i>PMT</i> de <i>P. digitatum</i> |
|-------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| <i>PMT1</i> | OJM115/OJM116 | 3 positivos/18 | 1 positivo/13 | 1 positivo/20 | pFOSPdigPMT1_05.11.15 |
| <i>PMT2</i> | OJM91/OJM92 | 2 positivos/23 | 1 positivo/18 | 1 positivo/46 | pFOSPdigPMT2_27.13.42 |
| <i>PMT4</i> | OJM93/OJM94 | 2 positivos/18 | 2 positivos/11 | 2 positivos/12 | pFOSPdigPMT4_06.09.02 pFOSPdigPMT4_06.09.06 |

Una vez se identificaron los distintos fósmidos positivos, se procedió a la secuenciación de los genes *PMT* y regiones adyacentes mediante paseo cromosómico. La **Figura 36** muestra el ensamblaje de todas las secuencias génicas obtenidas para cada fósmino positivo como resultado de las distintas rondas de secuenciación, realizadas con oligonucleótidos específicos diseñados sucesivamente a lo largo del paseo cromosómico (**Tabla 8** de Materiales Y Métodos). Así, se obtuvieron una longitud total de 6235 pb, 3891 pb y 5371 pb de secuencias nucleotídicas de cada fósmino individual secuenciado: pFOSPdigPMT1_05.11.15, pFOSPdigPMT2_27.13.42, y pFOSPdigPMT4_06.09.02, respectivamente. El análisis BLAST de las secuencias obtenidas permitió en primer lugar confirmar la identificación de los tres genes *PMT* de *P. digitatum* (**Tabla 18**). Por tanto, esta estrategia hizo posible el aislamiento de las secuencias completas de los tres genes *PdigPMT* que resultaron ser ortólogos a los correspondientes genes identificados en el genoma de *P. chrysogenum* *PMT1* (Pc20g07670), *PMT2* (Pc12g05130) y *PMT4* (Pc21g05160), compartiendo el 92 %, 94 % y 92 % de identidad nucleotídica, respectivamente. *PdigPMT1* y *PdigPMT2* están interrumpidos por tres intrones y tienen un ORF de 2814 pb y 2235 pb, respectivamente, mientras que *PdigPMT4* tiene 2331 pb con dos intrones (**Figura 37**). Además, los tamaños de las secuencias codificantes y la presencia de intrones fueron confirmados a través de la amplificación por PCR con oligonucleótidos diseñados para solapar con el codón de inicio y el codón de parada de cada gen usando como molde cDNA (experimentos no mostrados). Estos productos fueron clonados en el vector pGEM-T y secuenciados. El alineamiento realizado entre las secuencias genómicas

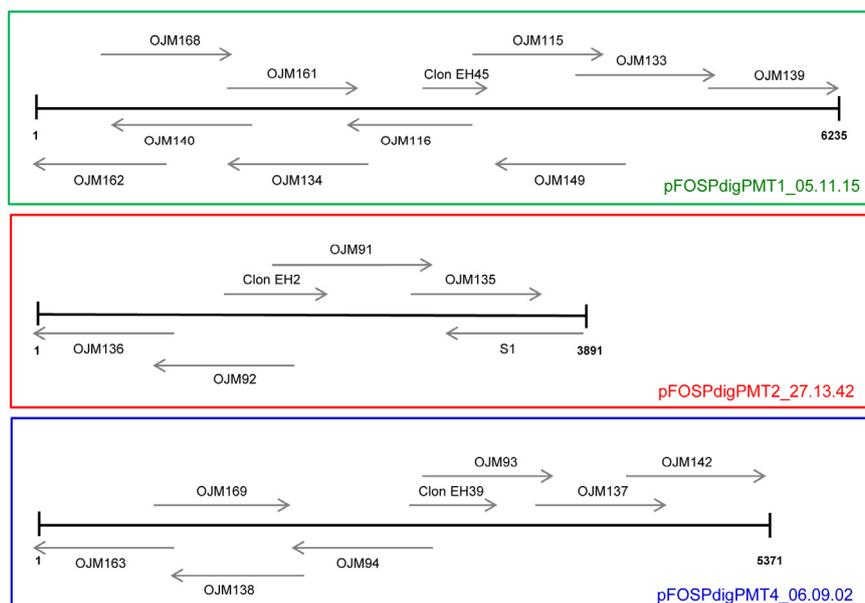


Figura 36. Paseo cromosómico sobre los fósmidos individuales identificados para aislar las secuencias completas de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

con sus respectivos cDNA usando el programa DNAMAN permitió corroborar los intrones para cada gen *PMT*.

El análisis de las secuencias también indica una elevada sintenia entre los genomas de *P. digitatum* y *P. chrysogenum* (**Tabla 18** y **Figura 37**). En la **Figura 37** se puede observar la organización genómica de *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* con sus genes vecinos en comparación con la distribución de los respectivos genes en el genoma de *P. chrysogenum* demostrando la sintenia existente en estas zonas del genoma entre estos dos hongos pertenecientes al género *Penicillium*.

Tabla 18. Análisis de homología de las secuencias obtenidas de los fósmidos portadores de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

| <i>P. digitatum</i> | Secuencias (pb) | <i>P. chrysogenum</i> | E- valor (% de Identidad) | Posible función molecular |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------|--|
| pFOSPdigPMT1 05.11.15 | 6235 | Pc20g07670 | 0 (92 %) | Manosiltransferasa de proteína (<i>PMT1</i>) |
| | | Pc20g07660 | 0 (90 %) | Factor de empalme pre-RNAm (<i>PRP21</i>) |
| | | Pc20g07680 | 3E-86 (98 %) | Proteína hipotética |
| pFOSPdigPMT2 27.13.42 | 3891 | Pc12g05130 | 0 (94 %) | Manosiltransferasa de proteína (<i>PMT2</i>) |
| | | Pc12g05120 | 1E-38 (88 %) | Transportador de glucosa (<i>HGT1</i>) |
| pFOSPdigPMT4 06.09.02 | 5371 | Pc21g05160 | 0 (92 %) | Manosiltransferasa de proteína (<i>PMT4</i>) |
| | | Pc21g05170 | 0 (80 %) | Proteína hipotética |

Se realizó un análisis *in silico* de las regiones no codificantes del extremo 5' de los genes *PMT* para poder identificar posibles secuencias reguladoras y de unión a factores de transcripción, mediante el programa MatInspector (<http://www.genomatix.de>). En la **Figura 38** se indican los resultados más representativos seleccionando aquellos que mostraron una relación de identidad próxima a 1 (0,99-1,00) entre las secuencias promotoras analizadas de los genes *PMT* con las secuencias consenso presentes en las bases de datos del MatInspector. Este análisis permitió revelar la presencia de posibles cajas TATA en las regiones promotoras que se localizaron a -562 pb, -512 pb y -486 pb del codón de inicio de transcripción para *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4*, respectivamente. El análisis indica que existe una mayor similitud en cuanto a la presencia de secuencias reguladoras entre los genes *PdigPMT1* y *PdigPMT2* que con el *PdigPMT4*. Se identificaron dos y cuatro sitios posibles de unión al factor de transcripción tipo Yap1p que participa en la respuesta a estrés oxidativo (Delaunay *et al.*, 2000) en los promotores correspondientes a *PdigPMT1* y *PdigPMT2*. También en el extremo 5' de *PdigPMT1* y *PdigPMT2*, se identificaron la secuencia consenso correspondiente al factor de transcripción Ste12 de respuesta a feromonas (García *et al.*, 2004; Heise *et al.*, 2010; Hoi y Dumas, 2010) y al regulador AbaA requerido para las etapas terminales de formación de conidióforos (Sewall *et al.*, 1990). Estos elementos correspondientes a Ste12 y AbaA regulan genes esenciales para el crecimiento celular y además son efectores de cascadas de señalización MAP quinasas (Schweizer *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2002).

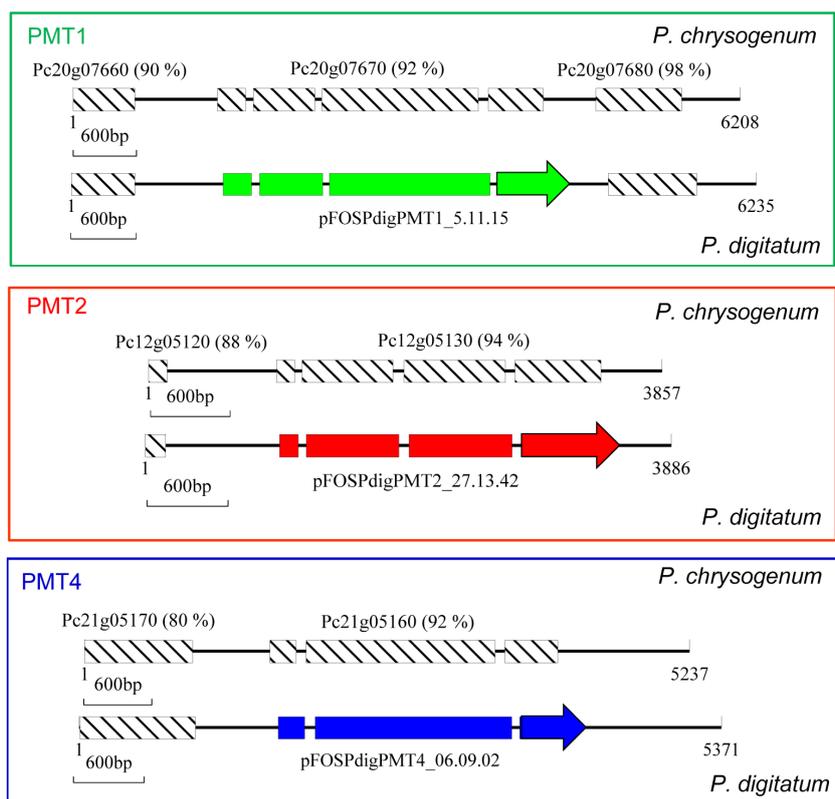


Figura 37. Organización genómica de los genes *PMT* de *P. digitatum* comparados con *P. chrysogenum*.

Se muestran en el diagrama los intrones y exones para cada gen *PdigMT* (en color) y la localización de genes vecinos. En la parte superior se indican las identidades de secuencia con *P. chrysogenum*.

En los promotores de los tres genes se encontró una posible caja GATA que serviría de unión a un regulador transcripcional del metabolismo nitrogenado (Scazzocchio, 2000). En la región promotora del gen *PdigPMT4* se encontraron dos dominios de unión del factor de transcripción *StuAp* relacionados con el desarrollo asexual de *A. nidulans* (Dutton *et al.*, 1997). Solo en *PdigPMT1* se encontró un sitio posible de unión al factor de transcripción dependiente de calcineurina que activa la señalización vía calcio (Matheos *et al.*, 1997). Coincidente con esto último, en *C. albicans* se demostró que la calcineurina es un posible regulador de la deficiencia de *PMT1* (Cantero y Ernst, 2011). Estos análisis *in silico* sugieren que

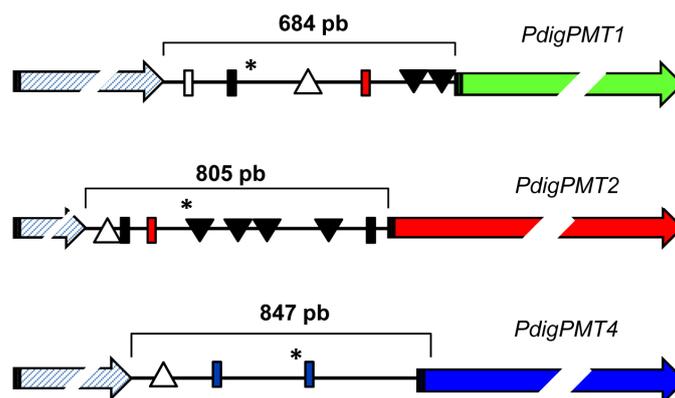


Figura 38. Sitios de unión a factores de transcripción en las regiones promotoras de los genes *PdigPMT* en *P. digitatum*.

Se indican las secuencias analizadas para cada gen *PdigPMT* y se muestran los siguientes elementos reguladores como caja TATA (en asterisco); caja GATA (triángulo blanco); y sitios de unión a los factores Yap1p (triángulo invertido negro); calcineurina (rectángulo blanco); Ste12 (rectángulo rojo), AbaA (rectángulo negro); StuA (rectángulo azul).

los genes *PdigPMT1* y *PdigPMT2*, tendrían una regulación génica similar (mayor coincidencia en los elementos encontrados) y separada de *PdigPMT4*.

2.4. Análisis de las secuencias de las proteínas Pmt de *P. digitatum*

Las secuencias génicas de *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* contienen pautas abiertas de lectura (ORF) que codifican para proteínas de 937, 744 y 776 aminoácidos, respectivamente. Además, presentan las siguientes características de masa molecular y punto isoeléctrico: 104,69 kDa/7,76 para PdigPmt1p; 84,77 kDa/7,68 para PdigPmt2p; y 88,29 kDa/7,19 para PdigPmt4p. Se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa DNAMAN para comparar las secuencias aminoacídicas deducidas PdigPmt1p, PdigPmt2p y PdigPmt4p con las secuencias de proteínas Pmtp de sus respectivos homólogos de hongos filamentosos; incluyendo además a *S. cerevisiae*. Este alineamiento permitió reconocer la presencia de los dos dominios característicos de la superfamilia de manosiltransferasas de proteínas (ver también Introducción). En la **Figura 39** se

muestra la zona altamente conservada del dominio PMT que está implicado en la actividad manosiltransferasa, y en donde se identifican los residuos conservados entre los miembros Pmtp de distintas subfamilias y de diferentes hongos.

En la **Figura 40** se muestra el dominio MIR formado por los subdominios A, B y C implicado en la unión a sustrato. En este alineamiento se ha observado que dichos subdominios están presentes en los homólogos identificados en *P. digitatum*. Se ha detectado que la localización de las zonas homólogas de los subdominios B y C están desplazadas y además resultaron ser más acotados a lo descrito en la literatura (Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach y Strahl, 2003). La secuencia del tetrapéptido Leu-His-Ser-His en el subdominio A está conservado en las tres proteínas Pmtp, e inclusive en el subdominio B de PdigPmt2p. El residuo de Cys en el subdominio B está conservado tanto en PdigPmt1p como en PdigPmt2p. Existe una inserción de siete aminoácidos Tyr-Asp-Asp-Gly-Arg-Ile-Ser en el subdominio A de PdigPmt4p similar a sus homólogos en *P. chrysogenum*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*. El alineamiento del dominio MIR también refleja que existe una mayor divergencia en la secuencia de Pmt4p.

| | | |
|------------|---|-----|
| Pdig_Pmt1p | RLFRITYQPTSVVFEDEVHFGGFASKYIKGKFFMDVHPP LAKLLLT | 114 |
| Pchr_Pmt1p | RLFRITYQPTSVVFEDEVHFGGFASKYIKGKFFMDVHPP LAKLLLT | 114 |
| Afum_Pmt1p | RLFRITYQSSVVFDEVHFGGFASKYIKGRFFMDVHPP LAKLLIT | 115 |
| Anid_Pmt1p | RLFRITYQPTSVVFEDEVHFGGFATKYIKGRFFMDVHPP LAKLLIT | 112 |
| Bcin_Pmt1p | RLFRITYQSSVVFDEVHFGGFASKYIKGKFFMDVHPP LAKLLIT | 106 |
| Scer_Pmt1p | RLHGLAWPDSVVFEDEVHFGGFASQYIRGTYFMDVHPP LAKMLYA | 107 |
| Pdig_Pmt2p | RLYQIGRSNIVTWDEAHFCKFGSHYLRKREFYFDVHPP LGKMLVG | 118 |
| Pchr_Pmt2p | RLYQIGRSNIVTWDEAHFCKFGSHYLRKREFYFDVHPP LGKMLVG | 118 |
| Afum_Pmt2p | RMYRIGRSNIVTWDEAHFCKFGSHYLRKREFYFDVHPP LGKMLVG | 135 |
| Anid_Pmt2p | RMYRIGRSNIVTWDEAHFCKFGSHYLRKREFYFDVHPP LGKMLVG | 116 |
| Bcin_Pmt2p | RLYKIGLSPITVWDEAHFCKFGSHYLRKREFYFDVHPP LGKMLVG | 117 |
| Scer_Pmt2p | RMYKIGINNHVVWDEAHFCKFGSYLRHEFYH DVHPP LGKMLVG | 122 |
| Pdig_Pmt4p | RFYRLDYPNEVVFEDEVHFGKFASYYLQRTYFFDVHPP FPKLLFA | 100 |
| Pchr_Pmt4p | RFYRLDYPNEVVFEDEVHFGKFASYYLQRTYFFDVHPP FPKLLFA | 100 |
| Afum_Pmt4p | RFYKISYPNEVVFEDEVHFGKFASYYLQRTYFFDVHPP FPKLLFA | 106 |
| Anid_Pmt4p | RFYKISYPDOVVFEDEVHFGKFASYYLRRTYFFDVHPP FAKLLLA | 101 |
| Bcin_Pmt4p | RFWGISHPNEVVFEDEVHFGKFASYYLERTYFFDVHPP FPKLLFA | 107 |
| Scer_Pmt4p | RFYKIWYPKVVFEDEVHFGKFASYYLERSYFFDVHPP FAKMMIA | 110 |

Figura 39. Alineamiento del dominio PMT de las proteínas de *P. digitatum* y hongos relacionados.

Se muestran las Pmtp de *P. digitatum* (Pdig), *P. chrysogenum* (Pchr), *A. nidulans* (Anid), *A. fumigatus* (Afum); *B. cinerea* (Bcin) y *S. cerevisiae* (Scer). Nótese los residuos altamente conservados de Arg (R), Asp y Glu (DE).

Se realizó una reconstrucción filogenética con las secuencias deducidas de PdigPmt1p, PdigPmt2p y PdigPmt4p y las de sus homólogos en *P. chrysogenum* y otros hongos filamentosos como *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *B. cinerea*, *N. crassa*, *M. grisea*, y la levadura modelo *S. cerevisiae*. Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X2 y el análisis filogenético se realizó con el método de Neighbor-Joining implementado en el programa MEGA 5.05. En la **Figura 41**, se muestra el árbol filogenético obtenido y en donde se pudo confirmar que las secuencias aminoacídicas deducidas en *P. digitatum* correspondían a un solo miembro para cada subfamilia PMT (**Figura 41**), de forma similar a lo que ha sido descrito en otros hongos filamentosos y en contraste con el caso de *S. cerevisiae*, en donde la duplicación génica ancestral en su genoma ha generado una multiplicidad en muchos de sus genes y en el caso que nos ocupa la existencia de seis genes *PMT* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

| | | |
|------------|---|-----|
| Pdig_Pmt1p | SLRHLNTGGY LSHPHMYFTG.....SKQQITLYPHKDNVFLLENS | 392 |
| Pchr_Pmt1p | SLRHLNTGGY LSHPHMYFTG.....SKQQITLYPHKDNVFLLENS | 392 |
| Afum_Pmt1p | SIRHLNTGGY LSHPHMYFTG.....SKQQITLYPHKDNVFLLENS | 393 |
| Anid_Pmt1p | SIRHHNTGGY LSHSHMYFTG.....SKQQITLYPHKDNVFLLENS | 390 |
| Bcin_Pmt1p | SIRHHNTGGY LSHSNLMYFTG.....SKQQITLYPHKDNVFLLENS | 384 |
| Scer_Pmt1p | SLRHLSTMGY LSHSHNYFAG.....SECQOSTLYPHMDANNWDLLELY | 378 |
| Pdig_Pmt2p | TLKNMGYGGI LSHVQTFPEG.....SMQQVTCYHHKANNDF.... | 386 |
| Pchr_Pmt2p | TLKNMGYGGI LSHVQTFPEG.....SMQQVTCYHHKANNDF.... | 386 |
| Afum_Pmt2p | TLKNMGYGGI LSHVQTFPEG.....SNQQVTCYHHKANNDF.... | 403 |
| Anid_Pmt2p | TLKNMGYGGI LSHVQTFPEG.....SSQQVTCYHHKANNDF.... | 384 |
| Bcin_Pmt2p | TIKNMGYGGI LSHIQTFPEG.....SNQQVTCYHHKANNDF.... | 346 |
| Scer_Pmt2p | SIKNQALGSI LSHIQTFPEG.....SNQQVTCYGYKANNDF.... | 390 |
| Pdig_Pmt4p | TMRHKDTKVF LSHHWKYLRYDDGRIS SQQVTCYPHNDTNNQWDLPG | 383 |
| Pchr_Pmt4p | TMRHKDTKVF LSHHWKYLRYDDGRIS SQQVTCYPHNDTNNQWDLPA | 383 |
| Afum_Pmt4p | TIRHKDTKVF LSHHEKYLRYDDGRIS SQQVTCYPFNDTNNHWDLPS | 389 |
| Anid_Pmt4p | TMRHKDTKVF LSHSDTYLRYDDGRIS SQQVTCYYPNDTNNHWDLIPT | 384 |
| Bcin_Pmt4p | QIKHKEHGY LSHSPDYLRYDDGRVSS QQVTCYYPANNHWDLVIPA | 390 |
| Scer_Pmt4p | TIKHQDTDAF LSHSLARYFQRYEDGRIS SAGQVTCYTHPFNNQWVFLP. | 390 |
| | | |
| Pdig_Pmt1p | DGSTRLYHVIHRRTHSHDERPP/TEA.DWQYEVSA YGEGFP GDANDLWR | 469 |
| Pchr_Pmt1p | DGSTRLYHAIHRRTHSHDERPP/TEA.DWQYEVSA YGEGFP GDANDLWR | 469 |
| Afum_Pmt1p | DGAVRLYHAMTHRRTHSHDERPP/TDV.DWQFEVSA YGEGFP GDANDLFR | 469 |
| Anid_Pmt1p | DGAVIRLHHLMTHRRVHSHNERPP/TDV.DWQFEVSA YGEGFP GDANDYWR | 467 |
| Bcin_Pmt1p | DGDVLKLYHQPTHRRTHSHDVRPP/TEA.DWQNEVSA YGEGFE GDANDFFR | 462 |
| Scer_Pmt1p | DGTVRLYHHTVTRCRLSHDHPV/SESSDWQKEVSCYGYSGFDGDANDDW | 444 |
| Pdig_Pmt2p | .GDVIRLIHGQTRNLHSHAI PAPT KS.HH..EVSSYGNITI.GDDKDHWK | 454 |
| Pchr_Pmt2p | .GDVIRLIHGQTRNLHSHAI PAPT KS.HH..EVSSYGNITI.GDDKDHWK | 454 |
| Afum_Pmt2p | .GDVIRLIHGQTRNLHSHAI PAPT KS.QY..EVSCYGNITI.GDEKDHWA | 471 |
| Anid_Pmt2p | .GDVIRLIHGQTRNLHSHAI PAPT KN.HH..EVSCYGNITI.GDDKDHWK | 452 |
| Bcin_Pmt2p | .GDVIRLVHSGTRNLHSHDVSAPITKA.DK..EVSCYGNITV.GDDKDHWT | 414 |
| Scer_Pmt2p | PGETSYLVHKSIGRNLHSHFVAAPVSKT.QW..EVSCYGNITV.GDNKDNV | 459 |
| Pdig_Pmt4p | NGDIICLRHVCTESYLLTHDVASFFPT.NQEFITVSELADGERHNDTLFE | 447 |
| Pchr_Pmt4p | NGDIICLRHICTESYLLTHDVASFFPT.NQEFITVSELADGERHNDTLFE | 447 |
| Afum_Pmt4p | NGDIVQLRHVGTDTILLTHDVASFYPT.NQEFITVSHELANGERHNDTLFE | 454 |
| Anid_Pmt4p | NGDIVQLRHVATDTILLTHDVASFYPT.NQEFITVSHELADGKRHNDTLFE | 449 |
| Bcin_Pmt4p | NNEVVRLRHVVNTMLLTHDVASFYPT.NQEFITVSEIDALGERLNDTLFE | 453 |
| Scer_Pmt4p | LNQHIRLRHVATDTYLLTHDVASFYPT.NEEITVTLEEGDGELYPETLFA | 454 |
| | | |
| Pdig_Pmt1p | FRLVHVMTCVLF SHKVKL.FEWGWEQOEVTCAKGGTLPNSV..WY.IES | 538 |
| Pchr_Pmt1p | FRLVHVMTCVLF SHKVKL.FDWGWEQOEVTCAKGGTLPNSV..WY.IES | 538 |
| Afum_Pmt1p | FRLVHVMTCVLF SHKVKL.FEWGFDQOEVTCAKGGTLPNSL..WY.IES | 538 |
| Anid_Pmt1p | FRLVHVMTCVLF SHKVKL.FDWGFDQOEVTCAKASLPNSI..WY.IES | 536 |
| Bcin_Pmt1p | FRLVHIMTCVLF SHKVKL.FEWASEQOEVTCAKGGTLPNSI..WY.VEQ | 531 |
| Scer_Pmt1p | FRLRHAMTCVLF SHEVKL.FAWGFEQOEVTCASSGRHDLTL..WY.VEN | 513 |
| Pdig_Pmt2p | FRLRHPVLGCYL RAGNVNL.FOWGFKQIE TTCCKENKPGDVYTHWN.VES | 523 |
| Pchr_Pmt2p | FRLRHPVLGCYL RAGNVNL.FOWGFKQIE TTCCKENKPSDVYTHWN.VES | 523 |
| Afum_Pmt2p | FRLRHIVLGCYL RAGNVNL.FOWGFKQIE TTCVKENNPDRVYTHWN.VES | 540 |
| Anid_Pmt2p | FRLRHAVLGCYL RAGNTNL.FOWGFKQIE TTCVKENKPRDVYTHWN.IET | 521 |
| Bcin_Pmt2p | FRLKHTSLGCYL RAGNVNL.FOWGFKQIE VTCTKDNPNKDRVYTHWN.VEA | 483 |
| Scer_Pmt2p | FRLKLEMGCYLAQTGNSL.FEWGFRQOEVTCKMKNPFKRDKRTWVN.IET | 528 |
| Pdig_Pmt4p | FRLVHVPTRVALWHTHTEPL.FEWGYKQAE INGNKNILQSSNAYVENIEN | 514 |
| Pchr_Pmt4p | FRLVHVPTRVALWHTHTEPL.FEWGYKQAE INGNKNILQSSNMMYVENIEN | 514 |
| Afum_Pmt4p | FRLIHVPTRVAMWHTHTEPL.FEWAFKQAE INGNKNILQTSNLWFVDTIES | 521 |
| Anid_Pmt4p | FRLVHVPTKVAWHTHTEPL.FDWAYKQAE INGNKNVLQSSNIWYVEAIES | 516 |
| Bcin_Pmt4p | FRLIHVPSKVAMWHTHTEPL.FDWAYKQAE INGNKNLAQSSNIWYVDEIFPS | 520 |
| Scer_Pmt4p | FRLHFVDTVALWHTHNDLPL.FDWGFKQAE INGNKVIDPSNWNWVDEIVN | 523 |

Figura 40. Alineamiento del dominio MIR de las proteínas Pmt deducidas de *P. digitatum* con las de otros hongos.

Se indican los tres subdominios del dominio MIR, donde se resalta el subdominio A: LSHX₃YPX₂₋₉SX(Q/G)QQ(V/I)TX₃DXNNX(W/F) en color verde, el subdominio B: LXHX₂TX₃L(H/L)(S/T)HX₄P en azul y el C: F(R/K)LXHX₆(L/M)X₆(H/G)X₃LXPXW(G/A)X₂QXE en rojo. Se muestran las zonas con una homología del 100 % en negro, del 75 % en rosa y del 50 % en celeste.

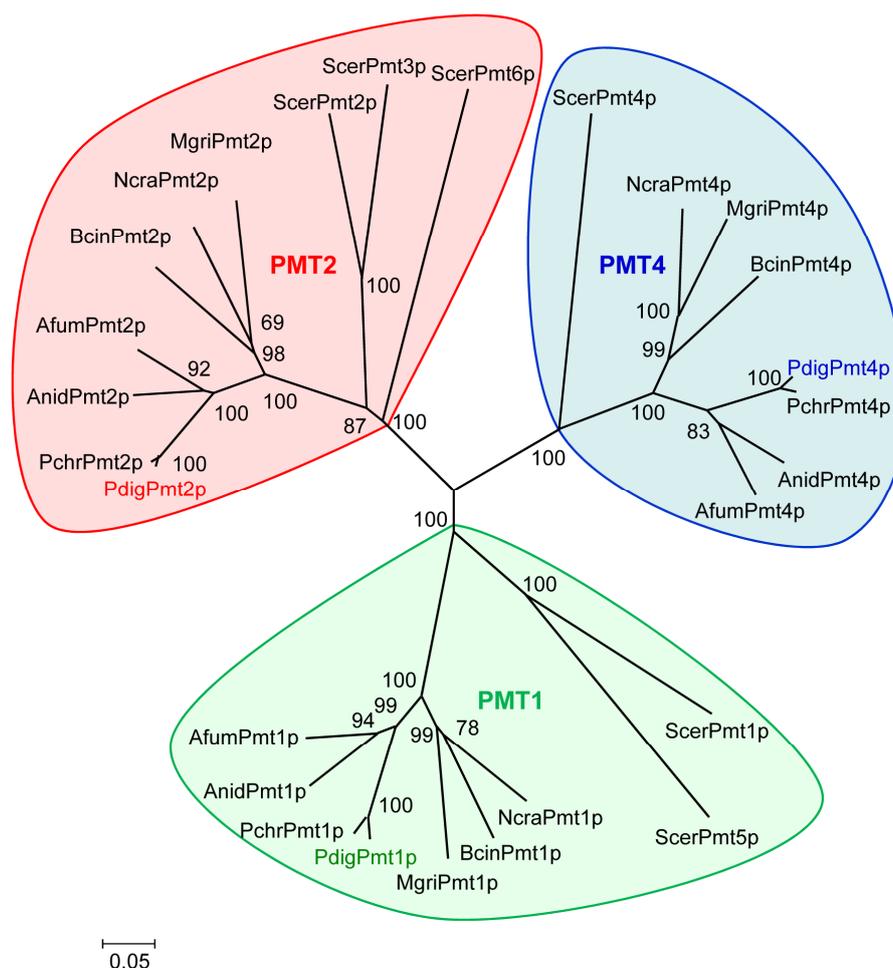


Figura 41. Árbol filogenético de las proteínas deducidas Pmt1p, Pmt2p y Pmt4p de *P. digitatum* y sus respectivos homólogos en otros hongos.

Las secuencias homólogas de *P. chrysogenum* (AM920435, AM920427, AM920436), *A. nidulans* (XM_657273, XM_657617, XM_653971), *A. fumigatus* (XM_749868, XM_745422, XM_742164), *B. cinerea* (BC1G_12913, BC1G_02981, BC1G_02548), *Magnaphorte grisea* (XM_366878, XM_367265, XM_361982), *N. crassa* (XM_960450, XM_951177, XM_958833) y *S. cerevisiae* [YDL095W, YAL023C, YJR143C, YOR321W (Pmt3p), YDL093W (Pmt5p), YGR199W (Pmt6p)] fueron obtenidas de las bases de datos de Broad Institute y NCBI. Este árbol fue creado con el programa Mega 5 utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining. Los porcentajes son valores bootstrap (relativos a 10000 repeticiones).

En la **Figura 42** se muestran esquemáticamente la organización de los dominios de las proteínas Pmtp deducidas en *P. digitatum* como resultado de su comparación con las familias de dominios de proteínas usando los programas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) y Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Por otro lado, también se identificaron los posibles sitios de N- y O-glicosilación usando los algoritmos de NetOGlyc v.3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) y NetNGlyc v.1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), respectivamente. Se detectaron dos, tres y cuatro regiones con residuos asparagina como potenciales sitios de N-glicosilación en las proteínas PdigPmt1p, PdigPmt2p y PdigPmt4p, respectivamente, y sólo se encontraron cuatro posibles sitios de O-glicosilación en PdigPmt1p. Todas las proteínas de la familia *PMT* en *S. cerevisiae* presentan siete dominios transmembrana en hélice α conservados y su topología consiste en un bucle hidrofílico central orientado al lumen del ER que está flanqueado por cinco dominios transmembrana amino-terminal y dos carboxi-terminal (ver Introducción). El análisis realizado con el programa TMHMM versión 2.0

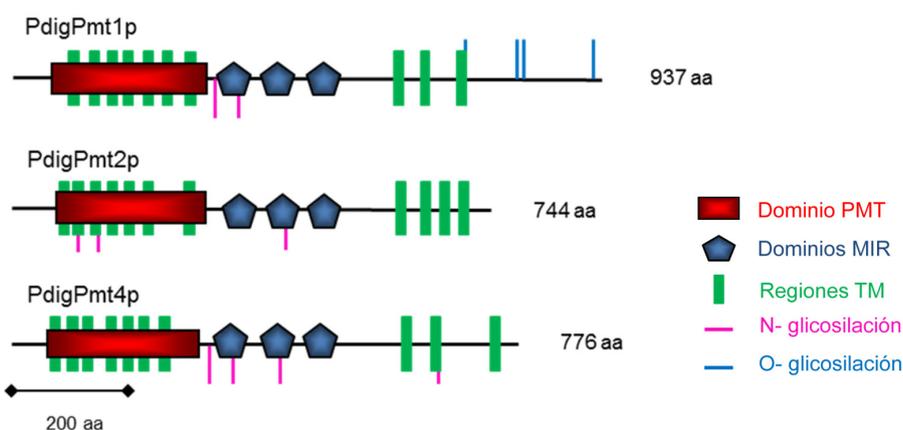


Figura 42. Organización de los dominios de la familia de proteínas Pmt deducidas en *P. digitatum*.

Se indican los dos dominios característicos PMT y MIR que están conservados en los homólogos Pmtp. Se muestran las posibles regiones transmembranas (TM) y los posibles sitios de N- y O-glicosilación según la presencia de residuos de asparagina y serina o treonina, respectivamente.

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001) predice diez posibles segmentos transmembranas para PdigPmt1p y PdigPmt2p, y nueve para PdigPmt4p. Seis dominios transmembranas estarían localizados en la región N-terminal y el resto al extremo C-terminal, dando lugar a una distribución típica de las proteínas Pmtp de *S. cerevisiae* a pesar de la diferencia en número de dominios transmembrana.

2.5. Caracterización funcional de los genes *PMT* de *P. digitatum* en *S. cerevisiae*

Con el objeto de demostrar la función PMT de los genes identificados en *P. digitatum*, se realizaron ensayos de complementación funcional en *S. cerevisiae* (ver apartado 16.3 de Materiales y Métodos) usando el sistema de recombinación homóloga *in vivo* en el vector pGREG505 (Jansen *et al.*, 2005). Este vector tiene el promotor *GAL1*, el cual es inducido en presencia de galactosa y reprimido con glucosa, y además permite la selección de las colonias recombinantes por prototrofia en medio de cultivo carente de leucina (ver apartado 16.3 y **Figura 12** de Materiales y Métodos). Partiendo de las secuencias conocidas de cDNA usadas anteriormente para confirmar la ubicación de los intrones en los genes *PdigPMT* se diseñaron tres pares de oligonucleótidos: OJM258/OJM259 para *PdigPMT1*, OJM260/OJM261 para *PdigPMT2* y OJM262/OJM263 para *PdigPMT4* (ver **Tabla 10** de Materiales y Métodos), los cuales presentaron unas secuencias adicionales en sus extremos (5' y 3') llamadas *rec1* y *rec2*, complementarias al plásmido pGREG505. En la **Figura 43A**, se ejemplifica la estrategia seguida para la obtención del plásmido recombinante pGREG505_*PdigPMT2*, en la cual se indica la recombinación homóloga esperada, a través de las secuencias complementarias en las secuencias codificantes amplificadas *PMT* del hongo. Como se observa en la **Figura 43B** se obtuvieron los amplicones de PCR esperados para cada gen *PMT* que se clonaron *in vivo* en el vector pGREG505 linearizado con *SalI*, desplazando de esta manera el gen *HIS3* (Jansen *et al.*, 2005). Esto se hizo usando el protocolo de transformación de levaduras descrito en el apartado 16.1 de Materiales y Métodos.

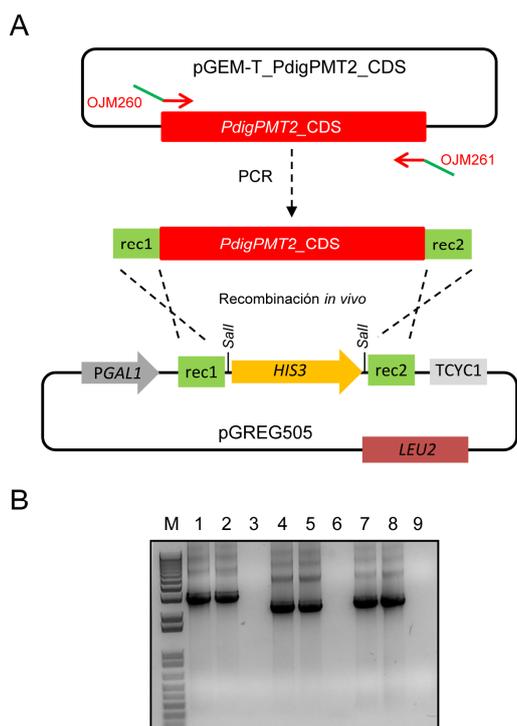


Figura 43. Análisis funcional de los genes *PMT* de *P. digitatum* en levaduras.

A) Esquema del vector generado en pGEM-T con la secuencia codificante del gen *PdigPMT2* (rectángulo rojo) (panel superior) y la integración del producto amplificado con OJM260/OJM261 en el vector pGREG505 quedando bajo la inducción del promotor *GAL1* (flecha gris) (panel central). Se indican los pares de oligonucleótidos diseñados para la recombinación homóloga *in vivo* en levaduras y en color verde se resaltan las secuencias complementarias al vector. B) Amplificación por PCR de las secuencias codificantes para *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* con los oligonucleótidos OJM258/OJM259 (líneas 1-2, 2,81 kb), OJM260/OJM261 (líneas 4-5, 2,23 kb) y OJM262/OJM263 (líneas 7-8, 2,33 kb), respectivamente, y líneas 3, 6, 9: controles negativos. Gel de agarosa 0,8 % en tampón TAE 1x. M: Marcador de peso molecular 1 kb DNA.

Los plásmidos recombinantes pGREG505_*PdigPMT1*, pGREG505_*PdigPMT2* y pGREG505_*PdigPMT4* se confirmaron por secuenciación y, junto con el plásmido sin inserto (pGREG505) como control, se introdujeron en las cepas $\Delta pmt1$, $\Delta pmt2$, $\Delta pmt3$, $\Delta pmt4$, $\Delta pmt5$, $\Delta pmt6$ y en la cepa parental (BY4741) siguiendo la misma metodología usada anteriormente (ver apartado 16.1 de Materiales y Métodos). Se

confirmó por PCR la presencia de los genes *PMT* de *P. digitatum* en las colonias protótrofas obtenidas con el fondo genético de cada cepa deletante *PMT* de levadura y se seleccionó una de ellas para los estudios fenotípicos que se describen a continuación.

La existencia de complementación funcional de los genes *PMT* de *P. digitatum* introducidos en las cepas deletantes de levaduras se determinó mediante un ensayo de sensibilidad a CFW, basado en la mayor sensibilidad que presentan los mutantes en genes de O-glicosilación de proteínas, como ya se ha ejemplificado con $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae* (**Figura 18**). Es importante aclarar que, desgraciadamente, ninguna de las otras cepas deletantes Δpmt de *S. cerevisiae* mostró una sensibilidad incrementada y reproducible a CFW bajo nuestras condiciones experimentales de cultivo en medio sintético e inducción con galactosa. Por ello, se estudió sólo el fenotipo de las cepas recombinantes obtenidas con el fondo genético de $\Delta pmt2$ y BY4741. Las cepas transformantes se crecieron 24 h en condiciones de represión SC (-Leu +Glu) y luego se incubaron durante distintos tiempos (3-24 h) en medio de inducción SC (-Leu +Gal). Se realizaron dos ensayos independientes y dos réplicas técnicas en cada uno. Se comprobó que el crecimiento era lento en medio con galactosa como única fuente de carbono; por ello el experimento se realizó y fue positivo al cabo de 9 h de inducción (**Figura 44**). Se observó que el fenotipo de hipersensibilidad a CFW de la cepa deletante $\Delta pmt2$, se perdió sólo en la cepa transformante $\Delta pmt2$ _pGREG*PdigPMT2* y únicamente después de la inducción del promotor *GAL1*, y no en los controles correspondientes (**Figura 44**). Estos datos demuestran que *PdigPMT2* complementa funcionalmente a $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*. Por el contrario, las cepas $\Delta pmt2$ transformadas con los vectores pGREG*PdigPMT1* y pGREG*PdigPMT4* tuvieron fenotipos idénticos a la cepa control con el plásmido vacío ($\Delta pmt2$ _pGREG505), indicando que *PdigPMT1* y *PdigPMT4* no complementaron funcionalmente al $\Delta pmt2$ de levadura. Además, se comprobó que en las células transformantes crecidas en medio con glucosa no se activa el promotor *GAL1*, por lo cual no hubo cambios en la sensibilidad frente a CFW (**Figura 44**). Estos resultados demuestran que *PdigPMT2* de *P. digitatum*

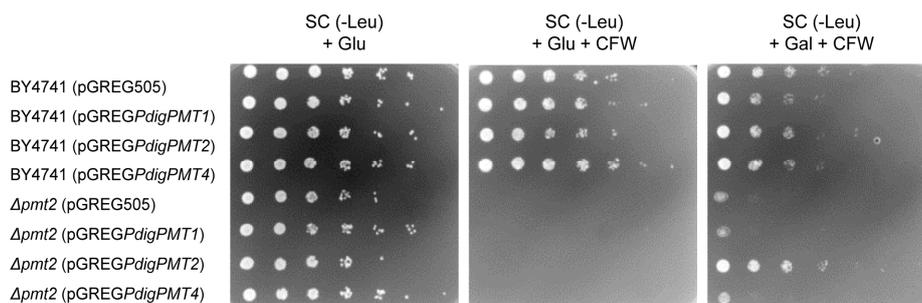


Figura 44. Complementación de la delección del gen *PMT2* en *S. cerevisiae* con los genes *PMT* de *P. digitatum*.

Las células de levadura fueron crecidas 9 h a 30 °C en medio líquido SC-Leu con glucosa o galactosa. Se aplicaron 5 μ L de diluciones seriadas 1/10 de estos cultivos DO₆₀₀ 0,1 sobre placas con medio SC-Leu conteniendo glucosa o galactosa; en presencia o ausencia de CFW 12,5 μ g/mL. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días. Nótese la sensibilidad del fenotipo $\Delta pmt2$ a CFW en condiciones de represión del promotor *GAL1* (glucosa) y como en presencia de galactosa (inducción) se pierde con *PdigPMT2*.

complementa funcionalmente el fenotipo de crecimiento de $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*.

2.6. Estudio de los cambios de expresión de los genes *PMT* durante el crecimiento axénico de *P. digitatum*

2.6.1. Expresión de la familia génica *PMT* en *P. digitatum* durante el crecimiento

Con el objeto de caracterizar la función de los genes *PMT* en el hongo *P. digitatum*, hemos analizado primero la expresión génica de *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* usando qRT-PCR cuantitativa bajo distintas condiciones de crecimiento del hongo y durante la infección sobre frutos cítricos. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican dentro de la región codificante para cada uno de los genes *PMT* (ver **Tabla 7** de Materiales y Métodos). Se optimizaron las condiciones de amplificación para cada uno de los pares de oligonucleótidos diseñados y se evaluó su eficiencia a través de qRT-PCR en diluciones seriadas de muestras de cDNA del hongo. En la **Figura 45**, se ejemplifican dos curvas estándar

obtenidas en función de los valores Ct detectados para cada dilución de cDNA usando los pares de oligonucleótidos OJM115/OJM116 para el gen *PdigPMT1* (**Figura 45A**) y OJM151/OJM152 para el gen de referencia L18 (**Figura 45B**). Así se obtuvieron las eficiencias de 1,70 para *PdigPMT1*, 1,88 (OJM91/OJM92) para *PdigPMT2*, y 1,73 (OJM93/OJM94) para *PdigPMT4*. Además, se calculó la eficiencia de los tres genes de expresión constitutiva usados como referencias, obteniéndose 1,95 para la proteína ribosomal L18 (González-Candelas *et al.*, 2010; Gandía *et al.*, 2012), 2,05 (OJM85/OJM86) para el gen β -tubulina (Sanzani *et al.*, 2009), y 1,87 (OJM74/OJM75) para la pequeña subunidad del RNA ribosomal r18S (Nair *et al.*, 2009).

En primer lugar, decidimos comparar el nivel de expresión de cada uno de los tres genes *PMT* entre sí. Para ello, se crearon tres curvas de regresión a partir de las amplificaciones obtenidas con cada pareja de oligonucleótidos específicos sobre diluciones seriadas de moles equivalentes y conocidos de los plásmidos individuales portadores de las secuencias parciales de cada gen *PMT* (pGEM-T_pmt1_EH43, pGEM-T_pmt2_EH2 y pGEM-T_pmt4_EH39). En la **Figura 46A**, se muestran las curvas de regresión que se obtuvieron para cada uno de ellos. Posteriormente, se utilizaron estas curvas para calcular la cantidad de moles

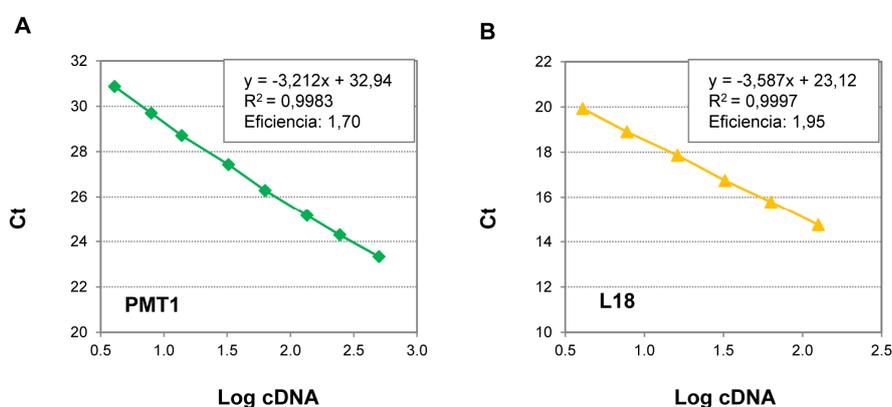


Figura 45. Curvas de calibración obtenidas por qRT-PCR para el gen *PdigPMT1* de *P. digitatum* (A) y para el gen de referencia L18 (B).

Se muestran los valores Ct promedios de tres repeticiones obtenidos en diluciones seriadas de una mezcla de muestras de cDNA.

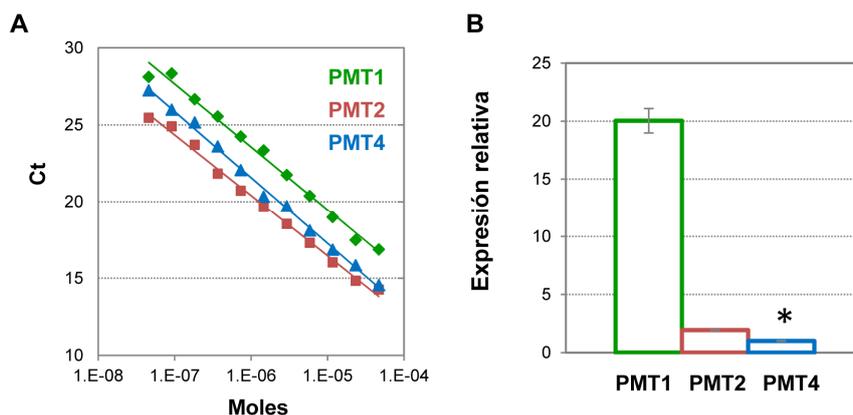


Figura 46. Cuantificación absoluta de la expresión de los genes *PMT* de *P. digitatum*.

A) Curvas estándar con los valores Ct obtenidos por qRT-PCR de diluciones seriadas de cantidades equimolares de cada plásmidos pGEM-T_pmt. B) Expresión relativa de los genes *PdigPMT* en medio líquido PDB (2 días) refiriendo los valores Ct a cantidades molares de cDNA (A) y relativizándolas al gen de menor expresión *PdigPMT4* (*).

equivalentes de cada cDNA presentes en distintas muestras experimentales. Así, se identificó que *PdigPMT4* es el gen que menos se expresa en el hongo crecido en medio líquido (PDB) durante 48 h, por lo que se usó su expresión para relativizar la de los otros dos genes. *PdigPMT1* presentó el valor de mayor expresión génica, siendo 20 veces superior a lo detectado con *PdigPMT4*. En cambio, el nivel de expresión detectado con el gen *PdigPMT2* en la misma muestra de cDNA fue dos veces superior a lo obtenido con *PdigPMT4* (**Figura 46B**).

Posteriormente, se determinó la concentración relativa de mRNA de cada gen *PMT* durante el crecimiento vegetativo *in vitro* del hongo en medio de cultivo líquido PDB. Es importante aclarar que en estos experimentos sólo se utilizaron dos genes de referencia (tubulina y L18) para determinar la expresión relativa de los tres genes *PMT* mediante el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002). Las variaciones de expresión génica se analizaron desde el primer hasta el sexto día de crecimiento, y la significación estadística se determinó simultáneamente para todos los tiempos con respecto al día 1 tomado como tratamiento control. Como se observa en la **Figura 47**, la expresión relativa de los tres genes *PMT* no varía de forma importante. *PdigPMT1* presenta una leve disminución de su mRNA en tiempos de crecimiento más tardíos, mientras que los niveles de mRNA de los otros dos *PMT*

aumentan ligeramente, siendo este aumento estadísticamente significativo para *PdigPMT2* a los 3 días y para *PdigPMT4* a los tres y seis días. Estos datos demuestran que los genes *PMT* se expresan durante el desarrollo vegetativo en cultivo sumergido, y que *PdigPMT2* es el gen que alcanza mayor inducción relativa (a los 3 días de iniciado el cultivo). Es muy importante aclarar, sin embargo, que la muestra de 2 días de este experimento es la analizada en la **Figura 46** y que por tanto, y a pesar de no presentar cambios significativos de expresión, *PdigPMT1* es el gen cuyo mRNA se acumula en mayor cantidad en estos experimentos (10-20 veces superior a los otros dos).

También fueron analizados los patrones de expresión relativa de cada uno de los genes *PMT* durante el crecimiento y esporulación del hongo en medio sólido PDA. En este caso, existió una inducción de los tres genes, que se caracterizó por un incremento en los niveles de mRNA con el tiempo (**Figura 48**). Durante el crecimiento en medio PDA, los mRNA de *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* se

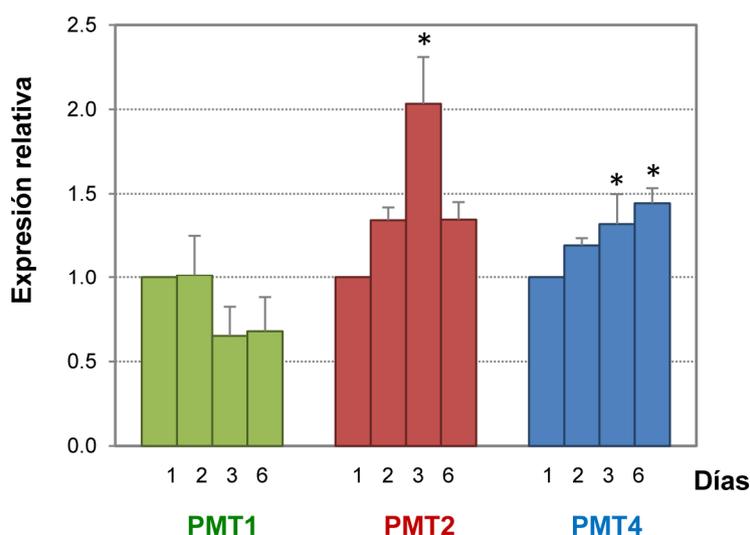


Figura 47. Expresión relativa de los genes *PMT* de *P. digitatum* durante el crecimiento en medio líquido PDB mediante qRT-PCR.

Los valores de expresión fueron normalizados al 1º día de crecimiento en medio PDB y se utilizaron dos genes de referencia tubulina y L18. Se indican las diferencias estadísticamente significativas a la condición control (1º día) en asterisco ($p < 0,05$).

fueron acumulando y este aumento fue coincidente con la producción de conidios del hongo. *PdigPMT2* fue el gen que mostró la mayor inducción bajo las condiciones de este ensayo. Estos resultados indican que los genes *PMT* se expresan durante el crecimiento en medio PDA y su inducción coincide con la esporulación de *P. digitatum*.

Posteriormente, se evaluó el efecto del estrés osmótico y oxidativo sobre los niveles de expresión de los tres genes *PMT*. Como se observa en la **Figura 49**, en este caso sí que hubo un comportamiento diferencial claro entre los tres genes. Los niveles de expresión de *PdigPMT2* y *PdigPMT4* se incrementaron cuando el hongo fue crecido tanto en presencia de H_2O_2 como de sorbitol. Mientras que los transcritos de *PdigPMT1* disminuyeron significativamente en el hongo crecido bajo las dos condiciones de estrés analizadas con respecto a lo detectado en la condición control (sólo medio PDA, 3 días). El incremento de expresión de

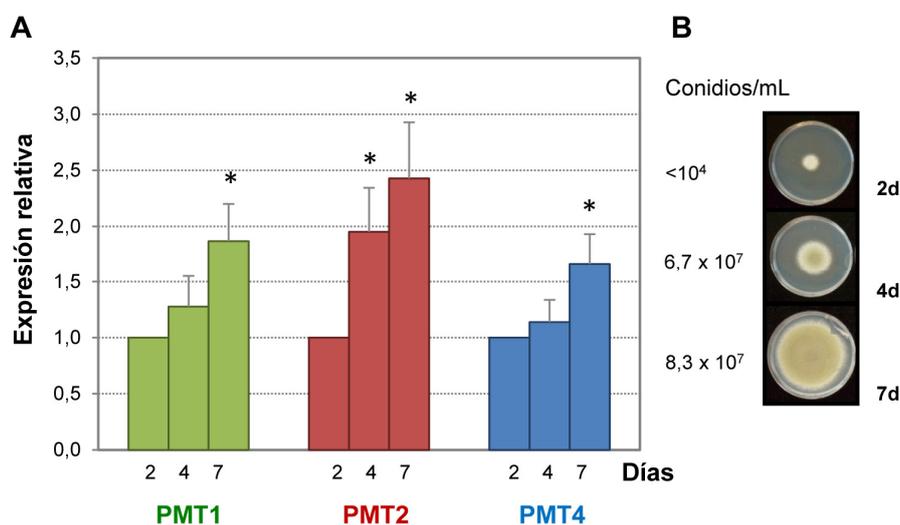


Figura 48. A) Expresión relativa de los genes *PMT* de *P. digitatum* durante el crecimiento en medio sólido PDA mediante qRT-PCR.

Los valores de expresión fueron normalizados al 2º día de crecimiento en medio PDA y se utilizaron dos genes de referencia tubulina y L18. Se indican las diferencias estadísticamente significativas a la condición control (2º día) en asterisco ($p < 0,05$). B) Crecimiento de *P. digitatum* en placas de medio PDA a los 2, 4 y 7 días. Se indican los niveles de esporulación obtenidos en cada día de crecimiento.

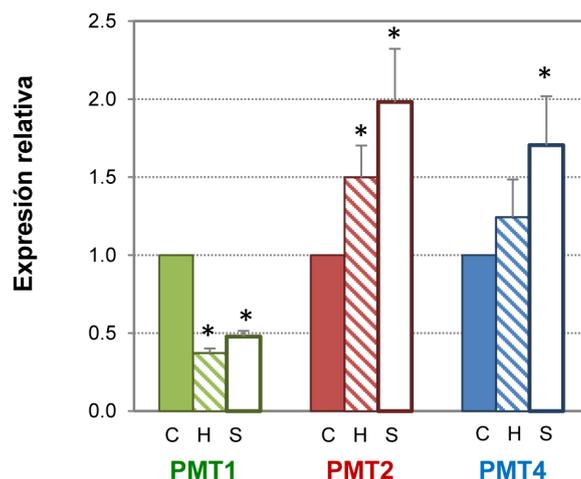


Figura 49. Expresión relativa de los genes *PMT* de *P. digitatum* durante el crecimiento en medio PDA bajo condiciones de estrés oxidativo y osmótico mediante qRT-PCR. Los valores de expresión fueron obtenidos al 3º día de crecimiento a 24 °C en placas con medio PDA (C) y suplementado con 1 mM de H₂O₂ (H) y 1,2 M de sorbitol (S). Se normalizaron a la condición control (C) y se utilizaron dos genes de referencia tubulina y L18. Se indican las diferencias estadísticamente significativas a la condición control (PDA) en asterisco ($p < 0,05$).

PdigPMT2 bajo estrés oxidativo mostró diferencias significativas en relación al control. Por otro lado, la inducción de *PdigPMT2* y *PdigPMT4* en el cultivo crecido bajo estrés osmótico fue estadísticamente significativa, siendo *PdigPMT2* el de mayor inducción. Estos datos sugieren que el estrés osmótico y oxidativo inducen la expresión de los genes *PdigPMT2* y *PdigPMT4*, mientras que influyen negativamente en la expresión de *PdigPMT1*. Nuestros datos vinculan la expresión de los genes *PMT* en respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales han sido relacionadas con respuestas de defensa en los frutos afectados por este hongo (Macarisin *et al.*, 2007).

2.6.2. Expresión de los genes *PMT* en el hongo *P. digitatum* expuesto al péptido PAF26

También se analizó el efecto de la exposición al péptido PAF26 sobre la expresión génica de la familia *PMT* en *P. digitatum*. Se analizaron los cambios de expresión génica con el tiempo (10 a 240 min) de un cultivo sumergido del hongo tratado con tres concentraciones de péptido: 1) una concentración sub-inhibitoria que no afecta significativamente el crecimiento de micelio (0,5 μ M), 2) una concentración próxima a la que inhibe el crecimiento al 50 % (2 μ M), y 3) una completamente inhibitoria (MIC) y que además es fungicida tras exposición prolongada (8 μ M).

En la **Figura 50** se muestran los resultados obtenidos con este experimento. En general, los niveles de transcritos fueron fuertemente reprimidos en todas las condiciones ensayadas, siendo este efecto mayor a mayor concentración de péptido y tiempo de exposición, con la única excepción de la concentración de 0,5 μ M de PAF26 durante 10 minutos donde hubo una ligera inducción de *PdigPMT1* con respecto a la condición control sin péptido aunque no resultó estadísticamente significativa. La represión de *PdigPMT2* y *PdigPMT4* fue más pronunciada en los tiempos prolongados de exposición (30-240 min) e incluso en aquellas muestras tratadas con PAF26 a concentraciones inhibitorias (2 y 8 μ M), en las cuales hubo diferencias significativas en la reducción de los transcritos detectados con respecto al control sin péptido. Estos resultados en su conjunto demuestran que la expresión de los tres genes *PMT* en el hongo *P. digitatum* es regulada negativamente por la exposición al péptido antifúngico, incluso a concentraciones sub-micromolares que no tienen un efecto visible sobre el crecimiento fúngico.

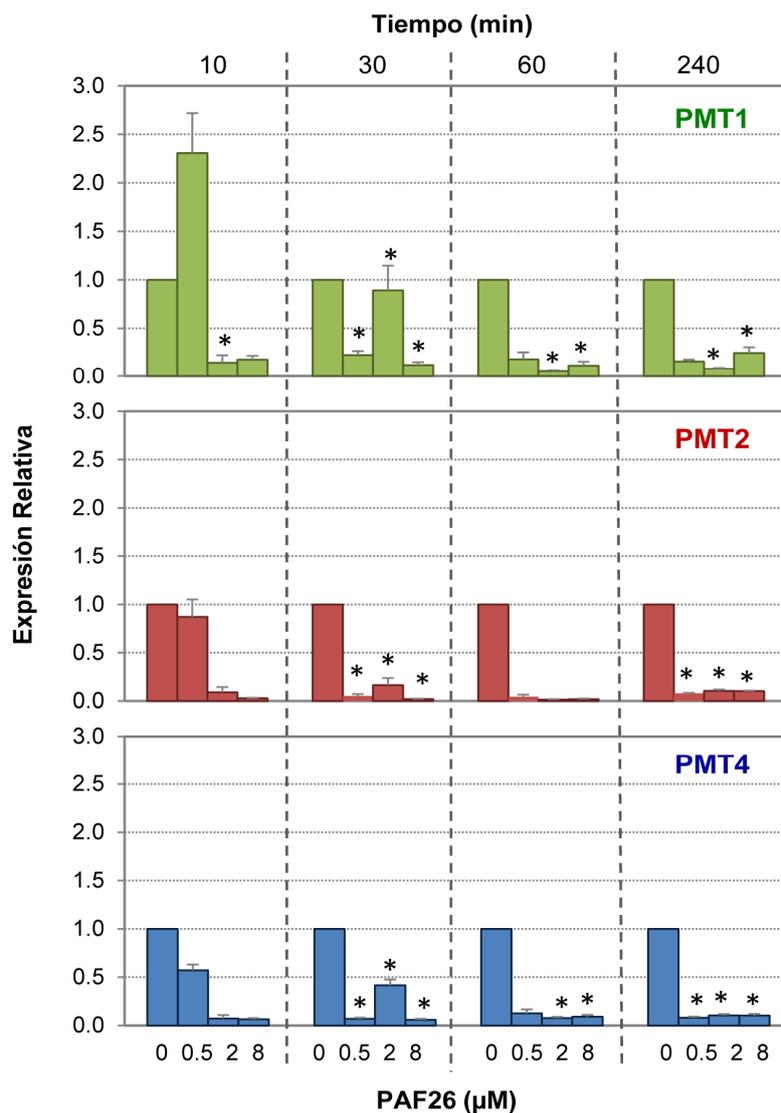


Figura 50. Expresión relativa de los genes *PMT* en cultivos sumergidos de *P. digitatum* expuestos al péptido PAF26 mediante qRT-PCR.

El hongo crecido en medio PDB al 20 % durante 72 h fue tratado con tres concentraciones de PAF26 (0,5-8 μM) durante cuatro tiempos (10-240 min). Los valores de expresión fueron normalizados a la condición control (sin péptido) para cada tiempo evaluado, y utilizando dos genes de referencia tubulina y L18. Se indican las diferencias estadísticamente significativas a cada condición control en asterisco ($p < 0,05$).

2.6.3. Análisis de los cambios de expresión génica de los genes *PMT* de *P. digitatum* durante la infección sobre frutos cítricos

Finalmente, se determinó la expresión de la familia *PMT* de *P. digitatum* durante el progreso de la infección sobre frutos cítricos en bioensayos de inoculación controlada. Estos ensayos fueron realizados durante dos campañas consecutivas de recolección de fruta, en los inviernos 2010/2011 y 2011/2012, y siguiendo metodologías previamente puestas a punto en nuestro grupo de postcosecha (González-Candelas *et al.*, 2010; Gandía *et al.*, 2012) (ver apartado 7 de Materiales y Métodos). Se constató que los tres genes *PMT* se expresaron relativamente poco durante la infección. Por ejemplo, en algunos experimentos en los que se tomaron muestras a 1, 2, y 3 días después de la infección sólo se detectó expresión en el último tiempo analizado. En la **Figura 51** se muestran los resultados obtenidos en dos ensayos independientes realizados en la campaña 2011/2012 sobre naranjas de variedad Navelina. Los Ct obtenidos por qRT-PCR en las muestras de cDNA fueron normalizados en función de los datos detectados para tres genes constitutivos (L18; β -Tubulina y la subunidad ribosomal r18s). No se detectó ningún transcrito de los tres genes *PMT* en estadios tempranos de infección (1 día) (datos no mostrados). A partir del día 2 se detectaron cantidades muy bajas de mRNA (valores de Ct próximos al valor umbral de 35), y que generalmente fueron en aumento durante el avance de la infección hasta el día final del experimento (7 dpi) (**Figura 51A**). La **Figura 51** también ilustra la variabilidad entre ensayos, ejemplificando que esta tendencia al aumento de la expresión fue menos clara en el caso del gen *PdigPMT1*, y más acusada y estadísticamente significativa para el gen *PdigPMT2*. En los dos ensayos representados, *PdigPMT2* alcanzó su máximo valor de expresión al 7 dpi, mostrando diferencias significativas con respecto a la condición control (2 dpi) y que superó en 5 y 10 veces en cada uno de los ensayos evaluados (**Figura 51A -B**).

Por otro lado, los transcritos detectados para *PdigPMT4* se incrementaron levemente con el tiempo, logrando alcanzar un aumento que de 1,7 a 2,3 veces superior a lo observado con la condición control (2 dpi) al 4 dpi y 7 dpi del avance de la infección. Como se observa en la **Figura 51C**, la esporulación sobre los frutos

empieza entre los días 4 y 5 después de la inoculación, para esta concentración de inóculo. Por tanto los datos de inducción de expresión, y en particular los de *PdigPMT2*, serían coincidentes con la esporulación sobre el fruto, de forma similar a lo que ocurre durante el crecimiento del hongo en medio PDA (**Figura 48**). Los resultados permiten concluir que los tres genes *PMT* de *P. digitatum* se expresan durante el progreso de infección sobre frutos de naranjas y *PdigPMT2* es el que

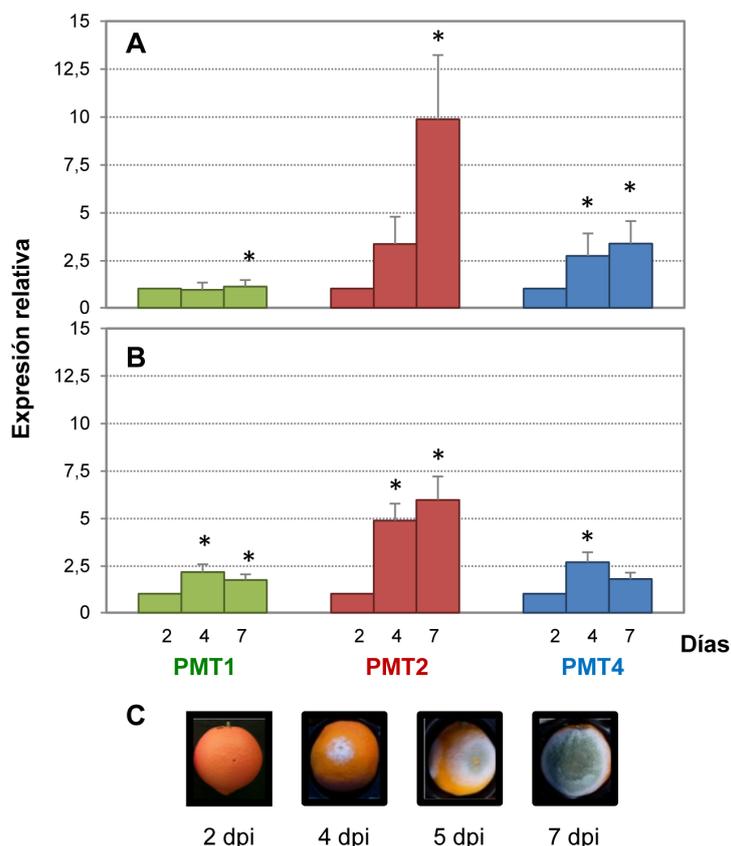


Figura 51. Expresión relativa de los genes *PMT* de *P. digitatum* durante el progreso de la infección sobre frutos de naranjas mediante qRT-PCR.

Se muestran los valores de expresión relativa para dos experimentos independientes de inoculación controlada con el hongo (A y B). En ambos casos, los datos se normalizaron al 2º día post-inoculación y se utilizaron tres genes de referencia tubulina, L18 y r18S. Se indican las diferencias estadísticamente significativas a la condición control (2 dpi) en asterisco ($p < 0,05$). C) Fotografías representativas de frutos infectados con el hongo a los 2, 4, 5 y 7 dpi. Nótese el incremento de la esporulación del hongo con el tiempo.

presenta una mayor inducción génica en los estadios más tardíos de colonización fúngica, que se correlacionaron con la esporulación sobre los frutos de naranjas.

3. Caracterización funcional del gen *PMT2* de *Penicillium digitatum*

Se ha demostrado que los genes *PMT* determinan la sensibilidad al péptido PAF26 en *S. cerevisiae* y que en *P. digitatum* se reprimen por la exposición al péptido e inducen durante la infección de frutos cítricos. Por todo ello, se consideró relevante profundizar en su caracterización funcional en *P. digitatum*. Se ha abordado la obtención de cepas transformantes con disrupción y expresión constitutiva de genes *PMT* de *P. digitatum* usando el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, el cual ha tenido que ser puesto a punto y optimizado. Posteriormente, se ha caracterizado molecularmente los transformantes resultantes y evaluado la implicación del gen *PdigPMT2* en el crecimiento, morfología y esporulación de *P. digitatum* así como su participación durante la infección de frutos cítricos y la respuesta a compuestos antifúngicos, incluyendo el péptido PAF26.

3.1. Obtención de los transformantes de los genes *PMT* en *P. digitatum*

Para realizar el análisis funcional de los genes *PMT* en *P. digitatum* se utilizó la transformación mediada por *A. tumefaciens* (ATMT). Para ello, en primer lugar fue necesaria la obtención de vectores binarios que portaran las construcciones necesarias para la disrupción y la expresión constitutiva de cada gen *PMT*. Para la disrupción de los genes *PMT* en *P. digitatum* se utilizó el vector pGKO2 (ver **Figura 14** de Materiales y Métodos) (Khang *et al.*, 2005; Khang *et al.*, 2007). El vector binario pBht2 (Mullins *et al.*, 2001) fue usado para la expresión constitutiva de los genes *PMT* (ver **Figura 15** de Materiales y Métodos).

Tabla 19. Relación entre secuencias homólogas y no homólogas para la construcción del casete de interrupción por PCR Fusión con los tres genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Vector | HS_5' | HS_3' | HS | NHS | HS/NHS | Clonado con |
|------------|--------------------------|--------------------------|------|------|--------|-------------------------------|
| pGKO2_Pmt1 | 1011 pb OJM187/OJM215 | 1006 pb OJM216/OJM188 | 2017 | 1417 | 1,42 | <i>Hind</i> III/ <i>Sa</i> I |
| pGKO2_Pmt2 | 776 pb OJM189/OJM217 | 762 pb OJM218/OJM190 | 1538 | 1417 | 1,09 | <i>Xba</i> I/ <i>Sa</i> I |
| pGKO2_Pmt4 | 818 pb OJM207/OJM208 | 1278 pb OJM209/OJM210 | 2096 | 1417 | 1,48 | <i>Hind</i> III/ <i>Spe</i> I |

HS. Secuencias homólogas provenientes de las regiones 5' y 3' de cada gen *PMT*.

NHS. Secuencias no homólogas correspondientes al casete de higromicina.

Para generar las construcciones para la interrupción de cada gen *PMT* se siguió la estrategia de PCR de fusión (ver **Figura 13** de Materiales y Métodos). Si bien en este apartado se describen detalladamente los resultados obtenidos para el gen *PdigPMT2*, es importante recalcar que se utilizó el mismo procedimiento para la construcción de los disruptos en *PdigPMT1* y *PdigPMT4*. En la **Tabla 19**, se resumen datos básicos sobre las construcciones de interrupción para cada gen *PMT*. Como se muestra en el esquema de la **Figura 52A**, se diseñaron 6 oligonucleótidos de los cuales 4 de ellos fueron diseñados para amplificar el gen *PdigPMT2* y los otros 2 para el casete de higromicina (**Tabla 11** de Materiales y Métodos). Los tres productos de PCR se amplificaron por separado y correspondieron a: (I) extremo 5' del gen *PMT2* (776 pb), (II) el casete de higromicina (1,4 kb), y (III) extremo 3' del gen *PMT2* (762 pb), (**Figura 52B**, líneas I-III y **Tabla 19**). Los oligonucleótidos centrales OJM217 y OJM218 presentan secuencias complementarias de OJM197 y OJM198 para permitir la fusión de los tres productos independientes en la PCR de fusión final, en la cual se obtuvo un producto de 2,8 kb (**Figura 52B**, línea IV). Esta construcción se clonó en el vector pGEM-T generando el plásmido pGEM_Pmt2_Hyg (**Figura 52B**, línea C). El inserto resultante de la doble digestión de este plásmido con las endonucleasas *Xba*I y *Sa*I se clonó en el vector pGKO2. El vector generado (pGKO2_Pmt2) fue introducido en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*.

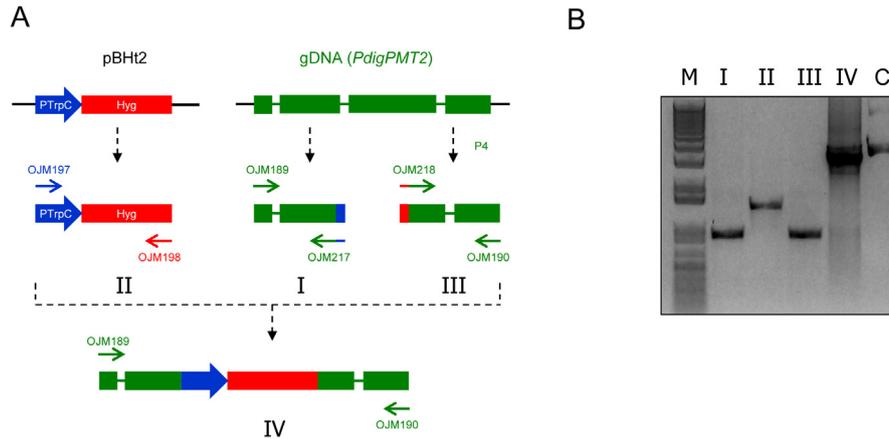


Figura 52. Construcción del casete para la disrupción del gen *PdigPMT2* de *P. digitatum*.

A) Esquema de la estrategia de PCR de Fusión usada para la disrupción génica. Se indican los pares de oligonucleótidos usados para la obtención por PCR de tres fragmentos individuales (I, II y III) y al final se muestra el producto final fusionado (IV). B) Amplificación por PCR de la región 5' de *PdigPMT2* con OJM189/OJM217 (línea I); del casete de higromicina con OJM197/OJM198 (línea II); de la región 3' de *PdigPMT2* con OJM190/OJM218 (línea III); la fusión de los tres fragmentos independientes con OJM189/OJM190 (línea IV) y clon positivo (pGEM-T_pmt2_Hyg) con OJM189/OJM190 (línea C). Gel de agarosa 0,8 % en tampón TAE 1x. M: marcador de peso molecular 1 kb DNA.

Para la obtención de las construcciones de expresión constitutiva de los genes *PMT* en *P. digitatum* se pusieron las secuencias génicas completas de los tres genes *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* (amplificadas desde DNA genómico) bajo el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* en el vector binario pBht2 (ver apartado 17.2 de Materiales y Métodos). Los amplicones de los genes completos *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* correspondientes a 3036 pb, 2434 pb y 2486 pb, respectivamente, se clonaron primero en pGEM-T, y subsecuentemente en el sitio romo *SmaI* de pBht2_PgpdA. Como anteriormente, solo se muestran en detalle los resultados obtenidos con el gen *PdigPMT2* (**Figura 53**). De nuevo, los plásmidos resultantes fueron introducidos en AGL1 y usados para la transformación de conidios de *P. digitatum* vía ATMT.

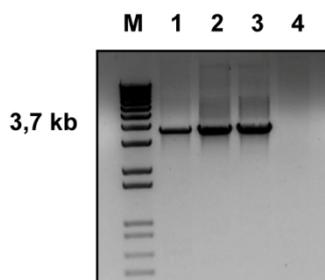


Figura 53. Construcción para la expresión constitutiva del gen *PdigPMT2* bajo el promotor *gpdA*.

Se muestra la amplificación por PCR con los oligonucleótidos (OJM195/190) de la construcción creada en el vector pBht2. M: marcador de peso molecular 1 kb DNA, líneas 1-3: tres clones positivos pBht2_Pmt2 y línea 4: control negativo. Gel de agarosa 0,7 %, en tampón TAE 1x.

En la **Tabla 20**, se muestra un resumen de los experimentos que fueron llevados a cabo para la búsqueda de disruptos de los genes *PMT* en *P. digitatum* siguiendo el protocolo de transformación ATMT puesto a punto y detallado en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos. Se realizaron 5 experimentos independientes para cada gen *PMT* en pGKO2. Los datos obtenidos en dichos ensayos, permitieron determinar que 3 días de co-cultivo entre *Agrobacterium* y conidios del hongo, y el uso de 1×10^7 conidios/mL resultaron en un aumento (2X) en el número de transformantes obtenidos con respecto a las alternativas ensayadas (ver más adelante). Se obtuvieron un total de 574 y 596 transformantes Hyg^R para pGKO2_Pmt1 y pGKO2_Pmt4, respectivamente; siendo ~15 % de los mismos positivos durante la selección negativa con F2dU 10 μ M (**Tabla 20**). Lamentablemente, cuando dichos transformantes resistentes a Hyg/F2dU fueron analizados por PCR, no presentaron la recombinación homóloga deseada, por lo que la frecuencia de falsos positivos (FP) en ambos casos fue del 100%. En relación a esto, Khang y colaboradores demostraron que la mayoría de FP se deben a integraciones ectópicas de secuencias truncadas en el borde del T-DNA que afectan al *HSVtk*, e impiden su expresión correcta y por consiguiente generan escapes en F2dU (Khang *et al.*, 2005). Los resultados negativos de los tres

Tabla 20. Resumen de los ensayos realizados para la obtención de los disruptos en los tres genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Vector | Exptos | Hyg($\mu\text{g/ml}$) | R-Hyg | R-F2dU | R-Hyg/R-2FdU | KO |
|----------------|--------|-------------------------|------------|-----------|--------------|----------|
| pGKO2_Pmt1 | Exp1 | 13 | 28 | 16 | 0,57 | 0 |
| | Exp2 | 13 | 35 | 8 | 0,23 | 0 |
| | Exp3 | 13 | 127 | 18 | 0,14 | 0 |
| | Exp4 | 50 | 192 | 22 | 0,12 | 0 |
| | Exp5 | 50 | 192 | 20 | 0,10 | 0 |
| Totales | | | 574 | 84 | 0,15 | 0 |
| pGKO2_Pmt2 | Exp1 | 13 | 0 | 0 | 0,00 | 0 |
| | Exp2 | 13 | 28 | 0 | 0,00 | 0 |
| | Exp3 | 13 | 52 | 5 | 0,09 | 1 |
| | Exp4 | 50 | 66 | 7 | 0,11 | 0 |
| | Exp5 | 50 | 6 | 0 | 0,00 | 0 |
| Totales | | | 152 | 12 | 0,08 | 1 |
| pGKO2_Pmt4 | Exp1 | 13 | 18 | 3 | 0,17 | 0 |
| | Exp2 | 13 | 50 | 9 | 0,18 | 0 |
| | Exp3 | 13 | 144 | 15 | 0,10 | 0 |
| | Exp4 | 50 | 192 | 45 | 0,23 | 0 |
| | Exp5 | 50 | 192 | 21 | 0,11 | 0 |
| Totales | | | 596 | 93 | 0,16 | 0 |

R-Hyg. Número de transformantes resistentes a higromicina.

R-F2dU. Número de transformantes resistentes a F2dU (10 mM).

experimentos iniciales (**Tabla 20**), hicieron que aumentáramos la concentración de selección de Hyg hasta 50 $\mu\text{g/mL}$. El número de transformantes Hyg^R no cambió sustancialmente, pero los resultados continuaron siendo negativos.

Por razones desconocidas, los resultados con pGKO2_Pmt2 fueron cualitativamente diferentes. No se obtuvo ningún transformante Hyg^R en el primer ensayo de ATMT realizado. Al obtener este resultado, y en base a que existen estudios en los cuales se ha demostrado que en ciertos hongos filamentosos como por ejemplo en *A. fumigatus* es un gen esencial (Fang *et al.*, 2010), llegamos a pensar que el disrupto *PMT2* en *P. digitatum* pudiera ser letal. Por otro lado, también hay investigaciones que han comprobado que los deletantes en genes *PMT* tienen su pared celular con una estructura o composición anómala y debilitada. Por todo lo expuesto, decidimos en los siguientes experimentos incorporar como estabilizador osmótico sorbitol 1 M en las placas de selección (PDA + Hyg + Cef + Mox). En estas condiciones, se obtuvieron cepas resistentes, pero de nuevo en número inferior y por tanto con un resultado cualitativamente

diferente al de los dos genes anteriores. En la **Tabla 20**, se puede observar que siguiendo esta estrategia se obtuvieron menos transformantes Hyg^R B (152), de los cuales sólo 12 (8 %) fueron capaces de crecer en F2dU. El análisis por PCR de los mismos permitió identificar al transformante PDEH515 ($\Delta PdigPmt2$) que presentó la recombinación homóloga esperada, y cuya caracterización molecular se explicará con más detalle en el siguiente apartado. Este transformante único se obtuvo en el experimento número 3, y a pesar de que se hicieron dos experimentos adicionales en condiciones paralelas para tratar de obtener transformantes independientes, ello no fue posible.

En la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados para la expresión constitutiva de los tres genes *PMT* usando el vector binario pBHt2. En este caso, más sencillo desde el punto de vista mecánico ya que sólo se requiere una inserción ectópica en cualquier locus del genoma, no hubo problema en la obtención de transformantes. Al analizar los datos se puede constatar que, de nuevo, el aumento del tiempo de co-cultivo a 3 días incrementa el número de transformantes obtenidos. Por otro lado, al modificar la relación entre UFC de bacteria y hongo (cambiando la concentración de conidios/mL), claramente la eficiencia de transformación se incrementó aproximadamente en dos

Tabla 21. Resumen de los transformantes obtenidos para la expresión constitutiva de los tres genes *PMT* de *P. digitatum*.

| Vector binario | DO ₆₀₀ ^a | PHI26 ^b | Tiempo co-cultivo ^c | Número total |
|----------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------|
| pBHt2_Pmt1 | 0,55 | 1.00E+06 | 2 | 1 |
| | | 1.00E+07 | 2 | 4 |
| | | 1.00E+06 | 3 | 7 |
| | | 1.00E+07 | 3 | 8 |
| pBHt2_Pmt2 | 0,52 | 1.00E+06 | 3 | 6 |
| | | 1.00E+07 | 3 | 15 |
| pBHt2_Pmt4 | 0,56 | 1.00E+07 | 3 | 10 |
| | | 1.00E+08 | 3 | 11 |

a. Densidad óptica de la cepa AGL1 portadora de cada vector binario.

b. Concentración de conidios/mL usada en cada experimento.

c. Número de días de duración del tiempo de co-cultivo en cada experimento.

veces al utilizar una concentración de 10^7 conidios/mL. Sin embargo, al variar la concentración de 10^7 a 10^8 conidios/mL no se aumentó el número de transformantes obtenidos al usar pBht2_Pmt4. Estos resultados confirman que el tiempo de co-cultivo de 3 días y la concentración de conidios 10^7 UFC/mL resultaron en una mayor eficiencia para la obtención de transformantes vía ATMT en *P. digitatum* siguiendo el protocolo descrito en esta tesis.

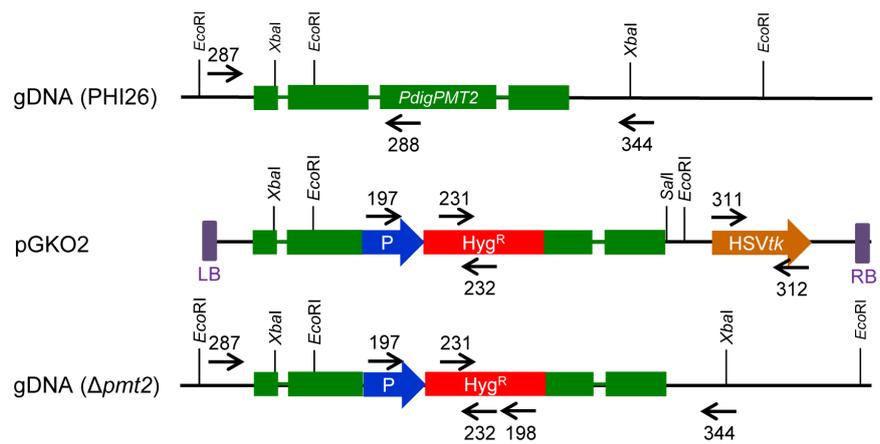
3.2. Caracterización molecular de los transformantes *PdigPMT2* obtenidos

La disrupción de *PdigPMT2* se confirmó a través de la amplificación por PCR con 6 distintas combinaciones de oligonucleótidos usando como molde el DNA genómico de dos transformantes: PDEH515 que es el mutante nulo de disrupción, y PDEH540 que contiene una inserción ectópica de la construcción, procede del mismo experimento de transformación y será utilizado en todo este trabajo como un control interno negativo. En la **Figura 54A**, se muestra el mapa de restricción del disrupto ($\Delta PdigPmt2$), la cepa silvestre (PHI26), y el T-DNA contenido en el plásmido correspondiente (pGKO2_Pmt2). En la primera PCR confirmatoria, se usó el par de oligonucleótidos OJM287/OJM344 (**Tabla 11**) que se localizaron fuera de las regiones 5' y 3' del gen utilizadas para la construcción. Como se muestra en la **Figura 54B**, se obtuvo un fragmento amplificado de 4,0 kb en el transformante PDEH515, cuya diferencia de tamaño de 600 pb con la banda obtenida en la cepa silvestre y en PDEH540, indica la integración del casete de higromicina por recombinación homóloga en el locus deseado. Además, se comprobó el reemplazo de la región intragénica del gen *PdigPMT2* por el casete de higromicina usando las combinaciones de oligonucleótidos OJM287/OJM232 y OJM231/OJM344, en las que OJM232 y OJM231 amplifican específicamente el marcador de selección (Hyg). Como se observa en la **Figura 54C** y **E**, se obtuvieron los fragmentos esperados de 2,0 kb y 1,7 kb sólo en el transformante PDEH515. Por el contrario, un producto de 1,6 kb amplificado en la cepa PHI26 y PDEH540 con los oligonucleótidos OJM287/OJM288, confirmando la existencia de la región completa del gen *PdigPMT2* sin reemplazar (**Figura 54D**). También se analizó la presencia del casete

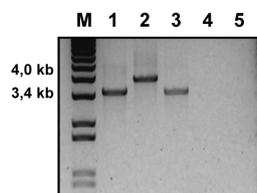
de higromicina en los transformantes PDEH515 y PDEH540, dando lugar a un fragmento amplificado de 1,4 kb (OJM197/OJM198, **Figura 54F**). El amplicón de la tiamina quinasa de 800 pb (OJM311/OJM312) sólo fue detectado en el transformante PDEH540 (**Figura 54G**), como resultado de la inserción no homóloga del T-DNA que dio lugar a una inserción ectópica de la construcción de disrupción.

Para el análisis molecular por hibridación Southern, el DNA genómico de la cepa PHI26 y los dos transformantes fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. Se utilizó como sonda un fragmento del gen *PdigPMT2* (523 pb) amplificado con los oligonucleótidos OJM190/OJM150 (**Figura 55A** y **Tabla 11**, Materiales y Métodos). Como se observa en la **Figura 55** (línea 2) se confirmó un evento de recombinación homóloga en el transformante PDEH515, ya que se detectó la presencia de una banda de hibridación de 4,2 kb correspondiente a la disrupción del gen *PMT2* y distinta del fragmento de menor tamaño (3,5 kb) de la cepa silvestre PHI26. Además, el transformante PDEH540 mostró dos fragmentos, uno de los cuales fue similar al fragmento obtenido con la cepa silvestre y el otro correspondió a un fragmento de 2,5 kb, indicando la inserción ectópica (**Figura 55B**, línea 3).

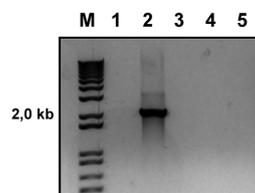
A



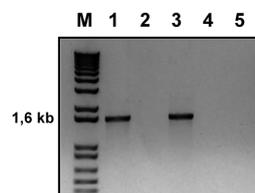
B (287-344)



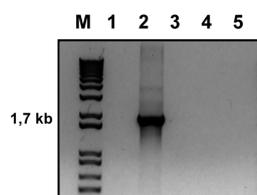
C (287-232)



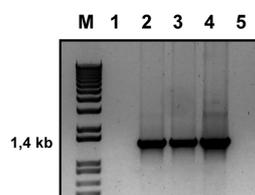
D (287-288)



E (231-344)



F (197-198)



G (311-312)

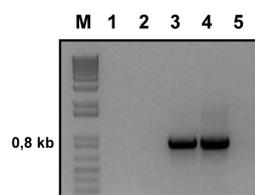


Figura 54. Disrupción del gen *PdigPMT2* de *P. digitatum*.

A) Esquema de la región genómica de *PdigPMT2* en la cepa silvestre PHI26 (panel superior), del mapa de T-DNA creado para la disrupción génica en el vector pGKO2 (panel medio) y la integración del casete de higromicina en la región de *PdigPMT2* mediante recombinación homóloga en el disrupto $\Delta pmt2$ (panel inferior). Se muestran los pares de oligonucleótidos utilizados para la confirmación por PCR de la disrupción génica. B) Amplificación por PCR de las regiones flanqueantes a la construcción usada (OJM287/OJM344), nótese la diferencia de tamaño en PDEH515 (línea 2) por la inserción del casete de higromicina. C) Producto amplificado entre la región flanqueante 3' de *PdigPMT2* y el casete de higromicina (OJM287/OJM232). D) Amplificación de la región flanqueante 5' de *PdigPMT2* y la zona reemplazada por el casete de higromicina (OJM287/OJM288). E) Producto amplificado entre la región flanqueante 5' de *PdigPMT2* y el casete de higromicina (OJM231/OJM344). F) Casete de higromicina amplificado con OJM197/OJM198. G) Amplificación del gen de tiamina kinasa (OJM311/OJM312). Se usó como molde 100 ng de gDNA de cada cepa, las líneas corresponden a 1. PHI26, 2. PDEH515, 3. PDEH540, 4. Control positivo pGKO2_Pmt2, 5. Control negativo. M. marcador de peso molecular 1 kb DNA. Geles de agarosa 0,8 % en tampón TAE1 x.

Por otro lado, también se llevó a cabo la caracterización molecular de los transformantes obtenidos para la expresión constitutiva del gen *PdigPMT2*. Se habían obtenido 21 transformantes del ensayo ATMT realizado con la construcción (pBHt2_Pmt2) que fueron Hyg^R (**Tabla 21**). En la **Figura 56A** se esquematiza el mapa del T-DNA transferido para la expresión constitutiva de *PdigPMT2*. Los transformantes fueron analizados por PCR sobre DNA genómico con dos combinaciones de oligonucleótidos (OJM197/OJM198 y OJM195/OJM196), que permitieron comprobar la presencia del casete de HygB así como también del promotor (*PgpdA*), respectivamente (**Tabla 11**, Materiales y Métodos). En la **Figura 56B** se muestran los resultados obtenidos de la PCR realizada con los oligonucleótidos OJM197/OJM198, dando un fragmento amplificado de 1,4 kb que indica la presencia del gen de resistencia a higromicina. En dicha figura se muestran solo los datos obtenidos con 3 transformantes (PDEH58, PDEH59,

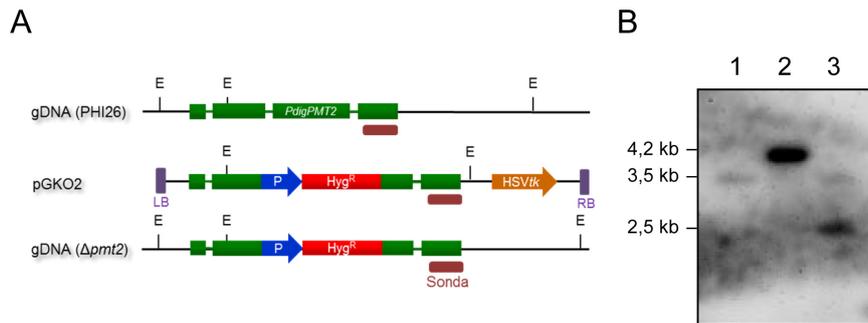


Figura 55. Análisis Southern del disrupto PDEH515.

A) Representación esquemática de la interrupción de *PdigPMT2* descrita en la Figura 54. B) Hibridación Southern. El DNA genómico (10 μ g) de las cepas fúngicas PDEH515 (línea 2), PDEH540 (línea 3) y la cepa silvestre PHI26 (línea 1) fue digerido con *EcoRI*, separado en agarosa y transferido a membrana de Nylon. Nótese la posición del fragmento de *PdigPMT2* (523 pb) usado como sonda.

PDEH67), que son los seleccionados para posteriores estudios en esta tesis. También se realizó el análisis por Southern utilizando como sonda de hibridación la misma que en la caracterización de los disruptos de *PdigPMT2*. Para ello, el DNA genómico también se digirió con *EcoRI*.

Como se observa en la **Figura 56C**, el mismo fragmento de 3,5 kb observado anteriormente y correspondiente al gen *PMT2* fue detectado tanto en la cepa PHI26 como en los tres transformantes analizados. Además, en dichos transformantes se observó una banda adicional de 1,9 kb como resultado de la inserción ectópica de la expresión constitutiva de *PdigPMT2* en el genoma. A su vez, dicha banda de hibridación fue mucho más fuerte en PDEH59 (línea 3). Esta mayor intensidad de hibridación, y su comparación con la intensidad de la banda endógena, sería un indicativo de la inserción de múltiples copias de la construcción en el mencionado transformante.

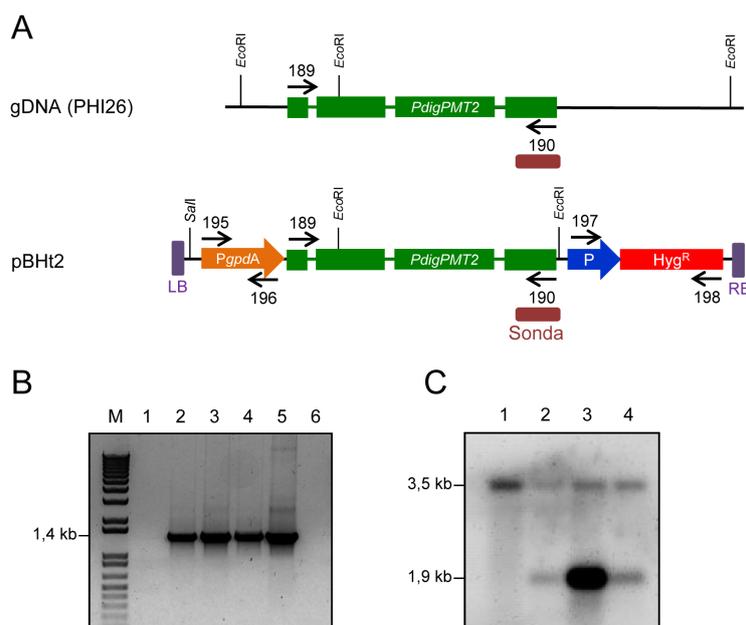


Figura 56. Expresión constitutiva del gen *PdigPMT2* en *P. digitatum*.

A) Esquema de la región genómica de *PdigPMT2* en la cepa silvestre PHI26 (panel superior) y del mapa del T-DNA creado en el vector pBht2 (panel central). Se indican los pares de oligonucleótidos usados en la amplificación de la construcción. B) Confirmación por PCR del casete de higromicina en tres transformantes obtenidos PDEH58, PDEH59 y PDEH67 (líneas 2, 3 y 4), en el vector pBht2_Pmt2 (línea 5), en la cepa silvestre PHI26 (línea 1) y control negativo (línea 6). C) Análisis Southern del gDNA de las cepas fúngicas digerido con *EcoRI* e hibridado con la sonda indicada (523 pb).

3.3. La interrupción del gen *PMT2* afecta el crecimiento y la esporulación de *Penicillium digitatum*

En este apartado se ha profundizado en la caracterización fenotípica de los transformantes obtenidos. Para determinar su capacidad de crecimiento, se evaluó diariamente el diámetro de las colonias formadas en placas de medio sólido PDA con el disrupto PDEH515, el transformante ectópico PDEH540 y la cepa silvestre PHI26. El disrupto PDEH515 presentó un fenotipo bastante peculiar que se caracterizó por la formación de una colonia de color blanquecina con bordes ondulados, de apariencia compacta y fuertemente adherida al medio PDA, y

claramente contrastó con las colonias obtenidas para las cepas PHI26 y PDEH540, que presentaron el típico crecimiento y coloración verde del hongo *P. digitatum* (**Figura 57A**). Además, como se observa en la **Figura 57B**, la velocidad del crecimiento radial de PDEH515 sobre medio sólido es claramente menor en comparación con las otras dos cepas. Esta reducción fue de aproximadamente un 40 % con respecto al crecimiento observado en la cepa silvestre a los 10 días de incubación a 24 °C. Estos datos sugieren que el gen *PMT2* es necesario para el correcto crecimiento radial de *P. digitatum*. Asimismo, la ausencia de coloración (**Figura 57**) es indicativa de defectos en la producción de conidios que se vieron confirmados desde el principio por la extrema dificultad en la obtención de los mismos (ver más adelante), ni siquiera utilizando placas de PDA crecidas durante más tiempo o en presencia de luz para favorecer la conidiogénesis.

Por otro lado, en el caso de los transformantes obtenidos para la expresión constitutiva de los genes *PMT*, no existieron diferencias en la tipología o fenotipo de las colonias desarrolladas en placas con medio PDA, que resultaron muy similares a las observadas con la cepa silvestre (datos no mostrados), ni siquiera en la cepa PDEH59 que parece tener más de una inserción génica.

En base a la existencia de investigaciones que asocian fenotipos de crecimiento lento con defectos en la estructura y estabilidad de la pared celular, se decidió comprobar el efecto sobre el crecimiento de la incorporación al medio PDA de un estabilizador osmótico (sorbitol 1 M). Como se muestra en la **Figura 58**, el defecto de crecimiento de PDEH515 se recuperó casi por completo en presencia de sorbitol, alcanzando unos valores de diámetro similar a lo observado en la cepa silvestre (PHI26) crecida en medio PDA sin osmoestabilizador. La velocidad de crecimiento del transformante ectópico (PDEH540) y de PHI26 fue también más rápida en presencia de sorbitol 1 M que en el medio control de PDA (**Figura 58A**). En las fotografías representativas de las colonias fúngicas obtenidas se puede observar que las cepas crecidas en medio de cultivo con sorbitol presentaron una masa miceliar bastante densa, de aspecto lanoso o algodonoso (**Figura 58B**). Aunque nuevamente en el disrupto PDEH515, la colonia continuó siendo blanquecina en ambos medios.

Como se observó el fenotipo de color blanquecino, se cuantificó el efecto de la disrupción del gen *PdigPMT2* sobre la producción de conidios. En todos los ensayos realizados con $\Delta PdigPmt2$ (PDEH515) en placas con medio sólido (PDA), la producción de conidios fue drásticamente menor comparada con las cepas PHI26 y PDEH540. En el experimento anterior, y después de 12 días de crecimiento, se recogieron y cuantificaron los conidios producidos por cada cepa en ambas condiciones de cultivo. El transformante PDEH515 produjo más de tres órdenes de magnitud menos conidios que la cepa silvestre PHI26 (**Figura 59**, 8×10^4 frente a 1×10^8 conidios/mL). En contraste, PDEH540 presentó unos valores de esporulación similares a la cepa silvestre. En presencia del estabilizador osmótico (sorbitol 1 M), la cantidad de conidios producidos por el disrupto PDEH515 (1×10^6 conidios/mL) fue 100 veces menor que la obtenida con PHI26 (1×10^8 conidios/mL). Este dato indica que la producción de conidios no se

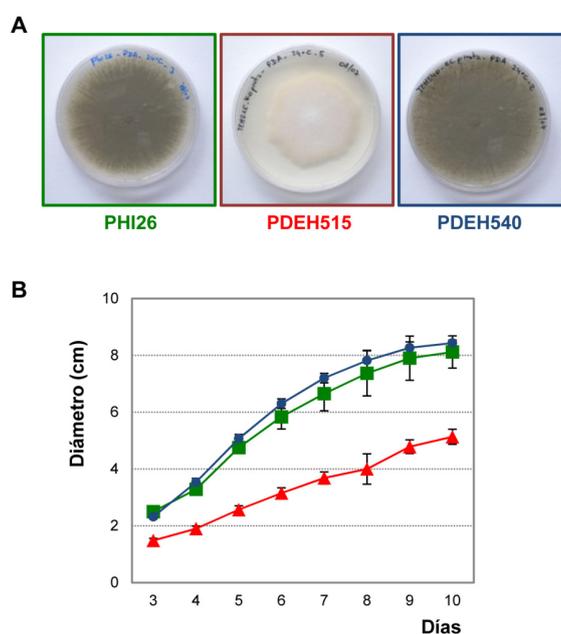


Figura 57. Fenotipo de crecimiento del disrupto PDEH515 en medio sólido PDA.

A) Colonias de PDEH515, PDEH540 y PHI26 crecidas en medio PDA y B) Crecimiento radial diario de los mismos. Se aplicaron $5 \mu\text{L}$ de una suspensión de 1×10^5 conidios/mL y se incubaron 10 días a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Los datos se representan como valores medios \pm SD de los diámetros registrados diariamente de 6 repeticiones.

recupera en el disrupto PDEH515 en presencia de sorbitol (**Figura 59**), aunque sí que lo hace su crecimiento (**Figura 58**).

La colonia de PDEH515 continuó siendo blanquecina incluso después de transcurridos de 15 a 30 días de cultivo en placa (datos no mostrados), lo cual está directamente relacionado con la severa reducción en esporulación demostrada. Estos datos en su conjunto indican que la función de *PdigPMT2* es esencial para la conidiogénesis de *P. digitatum* y no puede ser complementada por la presencia de ninguno de los otros dos genes *PMT*. Además las suspensiones de conidios

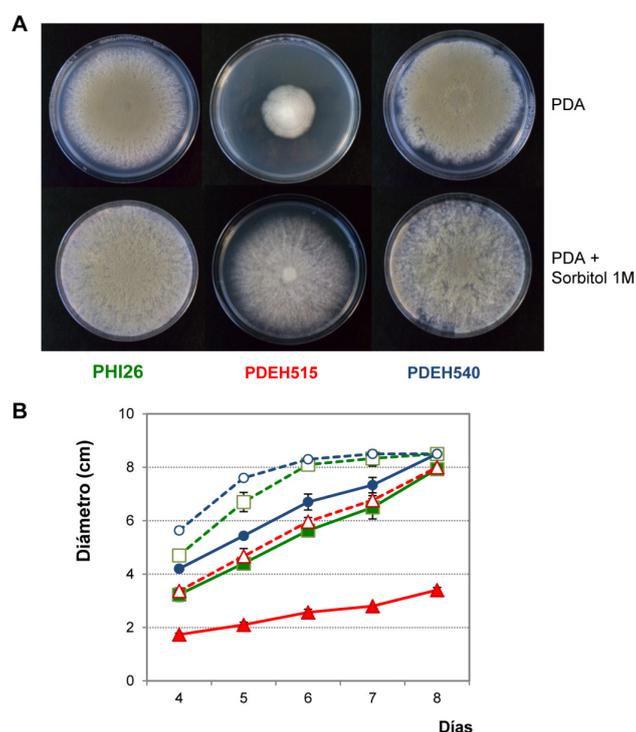


Figura 58. Efecto de sorbitol sobre el crecimiento del disrupto PDEH515 en medio sólido PDA.

A) Colonias de PHI26, PDEH515 y PDEH540 en medio PDA (panel superior) ó suplementadas con sorbitol 1 M (panel inferior) y B) Crecimiento radial diario de las mismas en medio PDA (líneas enteras) y PDA con sorbitol 1 M (líneas cortadas). Las placas se inocularon con 5 μ L de 1×10^5 conidios/mL de cada cepa fúngica y se incubaron 8 días a 24 °C. Los datos se representan como valores medios \pm SD de los diámetros registrados diariamente de 3 repeticiones.

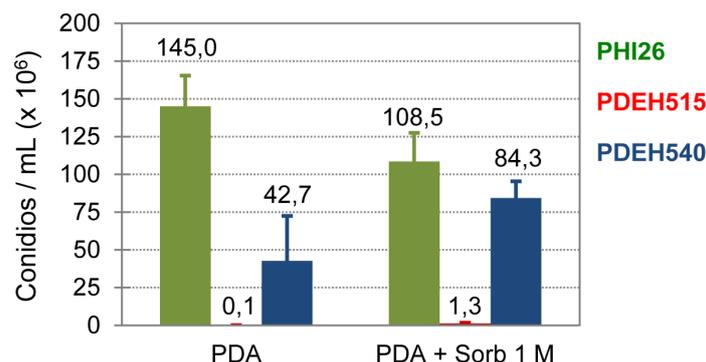


Figura 59. Efecto de sorbitol sobre la esporulación del disrupto PDEH515.

Se representan los conidios producidos por PHI26, PDEH515 y PDEH540 en medio sólido PDA y PDA con sorbitol 1 M después de 12 días de incubación a 24 °C. Los resultados se expresan como valores medios \pm SD de los conidios/mL ($\times 10^6$) obtenidos en 3 placas. Nótese la baja esporulación del mutante PDEH515 representada por las barras centrales en cada condición.

obtenidas de la cepa mutante fueron blanquecinas mientras que son verdes en el caso de PHI26.

3.4. Estudio de la morfología del disrupto PDEH515 por microscopía de fluorescencia

Se analizó la morfología de PDEH515 por tinción con CFW y microscopía de fluorescencia. En primer lugar, se analizó el efecto de la mutación sobre los conidios y estadios iniciales de germinación. Los conidios del disrupto PDEH515 fueron generalmente redondeados a diferencia de los conidios ovales característicos de PHI26 **Figura 60**. PDEH515 mostró conidios germinados después de 16 h de incubación, pero presentando un mayor número de septos a lo largo del tubo germinativo (**Figura 60D**). En la mayoría de los conidios analizados de PDEH515, el primer septo se formó en la zona del cuello del primer tubo germinativo. En PDEH515 se detectaron con cierta frecuencia ramificaciones que emergen del extremo apical del tubo germinativo (**Figura 60E**). Al mismo tiempo de crecimiento, en la cepa silvestre PHI26 solo se observó la elongación del tubo

germinativo sin presentar ningún tabique a lo largo de la hifa (**Figura 60C**), la cual tuvo un grosor menor al observado en el mutante. Hay estudios que documentan que la formación de septos es la barrera necesaria para el inicio de la formación de ramificaciones durante el crecimiento polarizado de los hongos (Harris *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1999). Estos datos indican que la disrupción de *PdigPMT2* se relaciona con la formación de septos y la emergencia de nuevos tubos germinativos durante los estadios tempranos de germinación.

Para estudiar los efectos durante el crecimiento vegetativo, se realizaron experimentos con ambas cepas (PDEH515 y PHI26) en los que se colocó una suspensión de conidios sobre unos portaobjetos, los cuales se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 24 °C en ambiente saturado de humedad (ver procedimiento

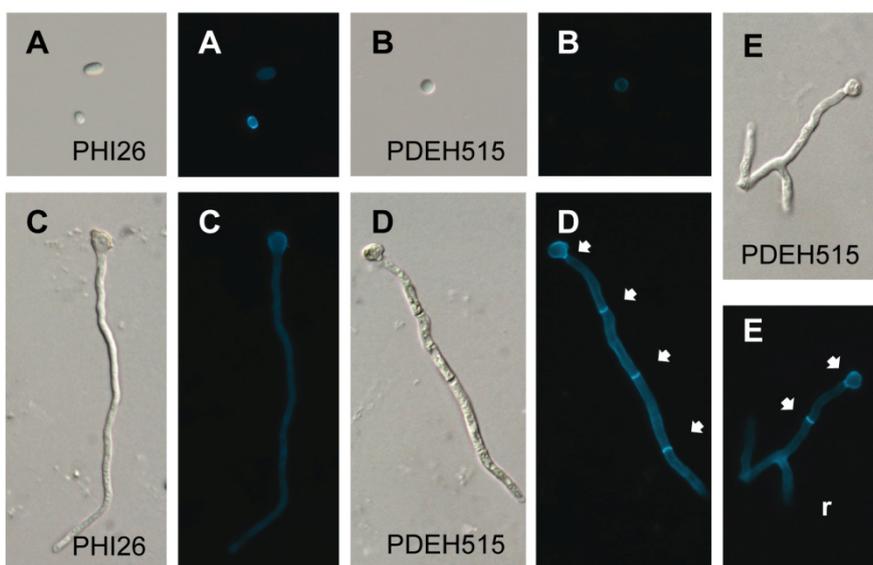
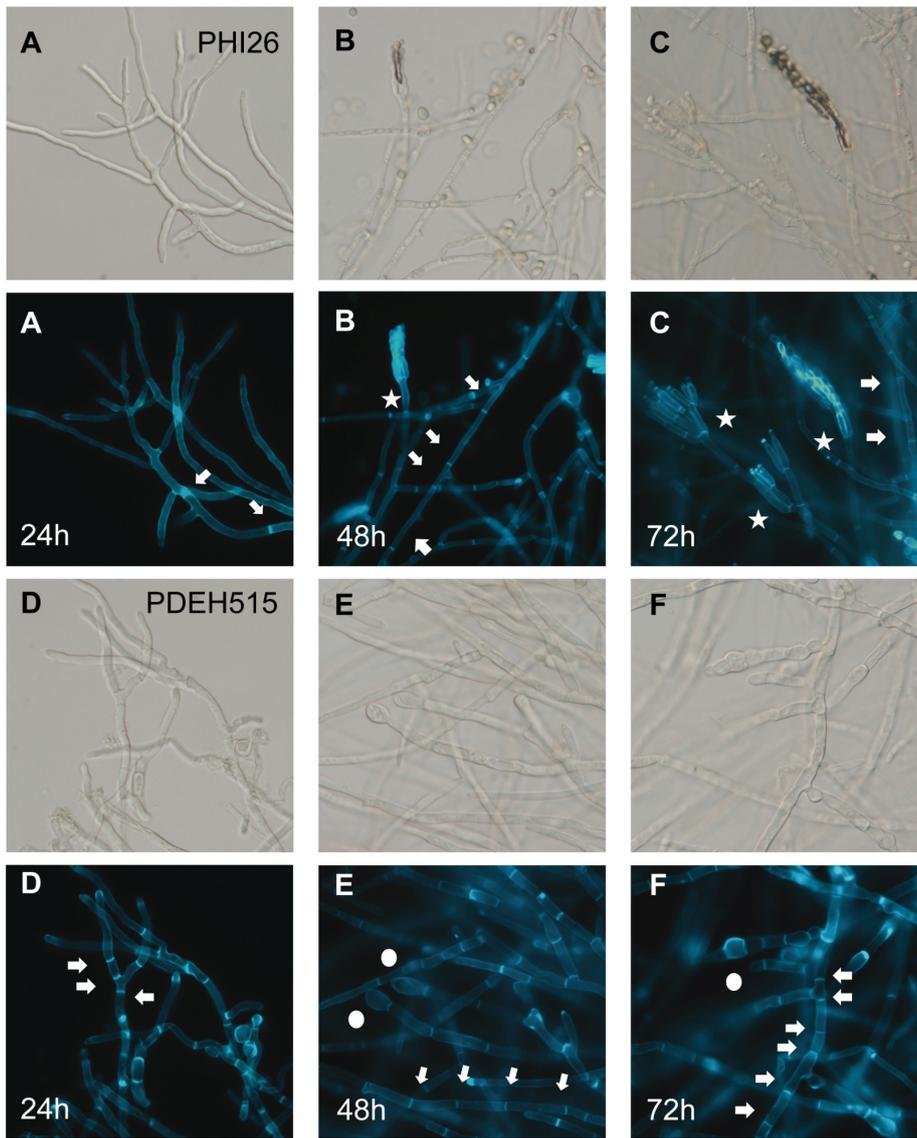


Figura 60. Germinación de los conidios de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515.

Se muestran fotografías de conidios sin germinar y germínulas crecidas en medio líquido PDB de PHI26 (A y C) y de PDEH515 (B, D y E) teñidas con CFW. Se incubaron 5×10^4 conidios/mL de cada cepa fúngica en PDB durante 16 h a 24 °C en agitación suave. Las fotografías se obtuvieron mediante microscopía óptica de fluorescencia con contraste interferencial (DIC) y fluorescencia azul (CFW) a 40x. Se indican la formación de septos (flechas) y ramificaciones (r).

detallado en apartado 6.2 de Materiales y Métodos). Como se ha visto en el experimento anterior durante las etapas tempranas de crecimiento (24 h) PDEH515 mostró un incremento en el número de tabiques en sus hifas (**Figura 61D**) comparado a lo observado en las hifas jóvenes de la cepa silvestre (**Figura 61A**). Además, el disrupto PDEH515 se caracterizó por presentar una masa de hifas que resultaron de mayor grosor después de 48 h de crecimiento (**Figura 61E**) y tuvieron distancias interseptales reducidas y un mayor número de tabiques generados, en comparación a PHI26 en donde los septos estuvieron separados regularmente a lo largo de la hifa (**Figura 61B**). Asimismo, PDEH515 presentó estructuras engrosadas con forma de balón en las regiones apicales de las hifas. Las alteraciones morfológicas visualizadas en el disrupto *PdigPMT2* fueron más evidentes a las 72 h de cultivo (**Figura 61F**), llegando a emerger bi- o tri-ramificaciones de las estructuras globulares formadas en los ápices de las hifas (**Figura 61G-H**). En etapas más tardías de crecimiento (7 días), PDEH515 mostró una morfología aberrante en su micelio, con un incremento de los engrosamientos celulares en las regiones sub-apicales y apicales de las hifas, y también una reducción drástica en su longitud debido a los numerosos septos formados (**Figura 61I**). Estos resultados demuestran que el gen *PdigPMT2* juega un importante papel durante el crecimiento vegetativo y el mantenimiento de la polaridad en *P. digitatum*.



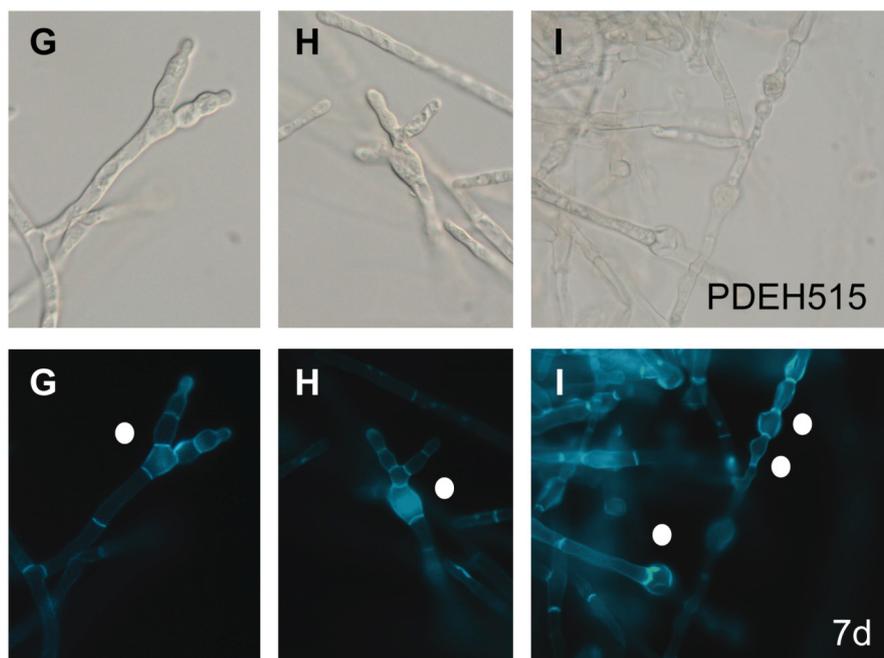


Figura 61. Crecimiento del micelio de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515. Se muestran fotografías del micelio crecido en medio líquido PDB a 24, 48 y 72 h de PHI26 (A, B y C) y de PDEH515 (D, E, F, G y H) e incluso a 7 días (I) teñidos con CFW. Se sembraron 5×10^4 conidios/mL de cada cepa fúngica en 100 μ L de medio PDB en el centro de portaobjetos y se incubaron a 24 °C, en ambiente saturado de humedad durante distintos tiempos. Las fotografías se obtuvieron mediante microscopía óptica de fluorescencia con contraste interferencial (DIC) y fluorescencia azul (CFW) a 40x. Se indican la formación de septos (flechas), estructuras globulares (círculos) y formación de conidióforos (estrellas).

En base a los resultados anteriores sobre la baja producción de conidios en el disrupto PDEH515, también se hizo un análisis microscópico de las estructuras formadas durante la conidiogénesis. En la cepa silvestre PHI26 predominó la presencia de estructuras de reproducción asexual o conidióforos dentro de la masa miceliar (**Figura 61C**). A las 48 h de iniciado el crecimiento se pudo observar el desarrollo de la estructura normal de conidióforos, con las tres partes

características: las métulas en la base de los conidióforos correspondientes a los distintos niveles de ramificación (dos en este caso), luego sobre cada métula se desarrollaron los grupos de 3 fiálides por cada métula y finalmente portando las cadenas de conidios en cada fiálide (**Figura 62A**). En contraste, la morfología de los conidióforos en PDEH515 fue anómala. Como se observa en la **Figura 62C**, generalmente por cada métula se formaron un número reducido de 1 o 2 fiálides. Con cierta frecuencia, se visualizaron fiálides demasiado alargadas y que en su ápice presentaban un tipo de células que no se correspondían con los conidios en formación de la cepa silvestre. Además, en estos ápices se marcaba claramente un

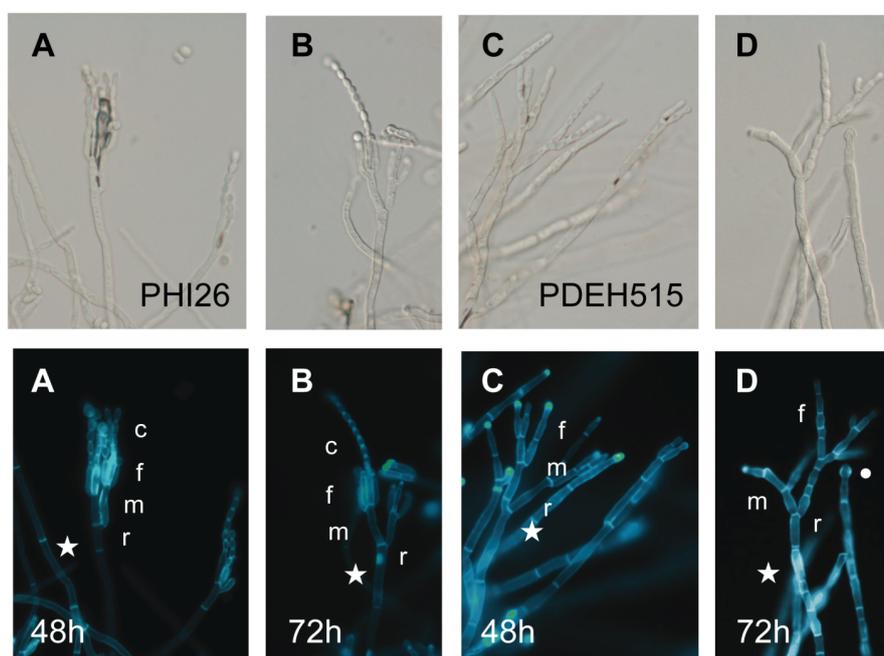


Figura 62. Reproducción asexual de la cepa silvestre PHI26 y el disrupto PDEH515.

Se muestran fotografías de los conidióforos formados en medio líquido PDB a 48 y 72 h de PHI26 (A y B) y de PDEH515 (C y D) teñidos con CFW. Se sembraron 5×10^4 conidios/mL de cada cepa fúngica en 100 μ L de medio PDB en el centro de portaobjetos y se incubaron a 24 °C en ambiente saturado de humedad. Las fotografías se obtuvieron mediante microscopía óptica de fluorescencia con contraste interferencial (DIC) y fluorescencia azul (CFW) a 40x. Se indica la estructura completa de conidióforos (estrellas) y sus partes: rama (r), métula (m), fiálides (f) y conidios (c).

aumento en la tinción con CFW que asemeja ápices de micelio vegetativo creciendo activamente.

Después de 72 h de cultivo, tampoco se pudieron distinguir claramente cada una de las partes de un conidióforo en PDEH515 (**Figura 62D**). Las estructuras que asemejan conidióforos presentaron un incremento en el número de tabiques dando lugar a una morfología anormal de células posiblemente conidiógenas. En conjunto, los supuestos conidióforos de PDEH515 parecían generar nuevas células hifales sobre las supuestas fiálides. Por otro lado, en PHI26 se visualizaron las largas cadenas típicas de conidios, producidos basipetalmente desde el ápice de cada fiálide (**Figura 62B**). Estas observaciones son consistentes con la reducida esporulación del mutante observada en los ensayos de crecimiento en PDA. Todos estos resultados confirman que el gen *PdigPMT2* es necesario para la conidiogénesis en *P. digitatum*.

3.5. Estudio de la influencia del gen *PdigPMT2* en la sensibilidad a compuestos antifúngicos

Los datos presentados hasta ahora indican la existencia de una pared celular debilitada o de estructura anómala en el disrupto PDEH515, tal y como también ocurre con el mutante $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*. En este contexto, se evaluó el comportamiento del disrupto de *PdigPMT2* y de los transformantes de expresión constitutiva obtenidos para los tres genes *PMT*, frente a distintos tratamientos y compuestos antifúngicos fundamentalmente relacionados con la integridad de pared celular. Los experimentos consistieron en inocular distintas diluciones de suspensiones de los hongos sobre placas con medio PDA conteniendo dos concentraciones de CFW, SDS y rojo Congo (CR) (**Figura 63**). PDEH515 presentó sensibilidad incrementada a CFW y sobre todo a CR, mientras que no se observaron diferencias entre la cepa PDEH540 (transformante ectópico) y la cepa silvestre (PHI26) frente a estos compuestos. Estos dos compuestos (CFW y CR) actúan directamente sobre componentes estructurales de la pared celular de los hongos tales como quitina y β -glucanos.

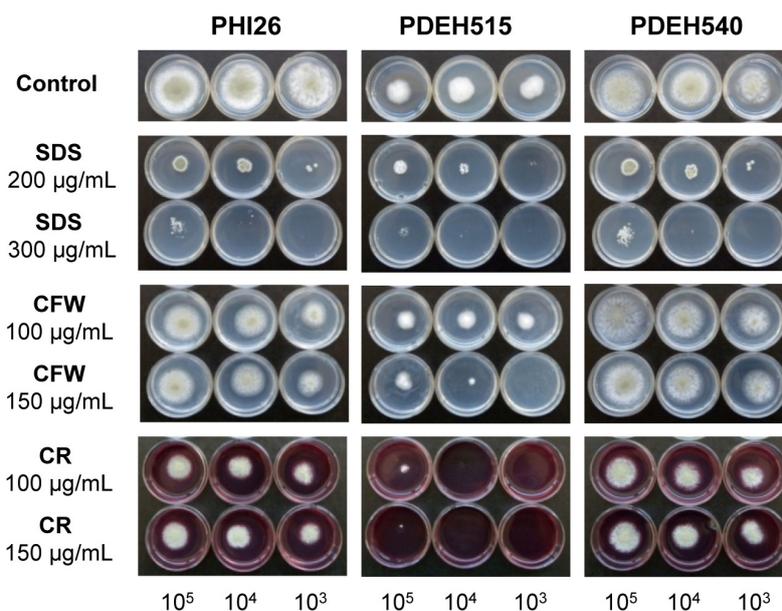


Figura 63. Sensibilidad de PHI26, PDEH515 y PDEH540 a distintos compuestos antifúngicos.

Se inocularon 5 µL de tres diluciones seriadas de 1×10^5 conidios/mL de cada cepa fúngica sobre medio PDA (control) y suplementadas con dos concentraciones de SDS, CFW y CR. Las placas se incubaron a 24 °C durante 4 días y se tomaron fotografías representativas de cada tratamiento.

Por otro lado, sólo hubo tenues variaciones en la sensibilidad de las cepas analizadas frente al detergente SDS, siendo PDEH515 ligeramente más sensible. El SDS es un detergente aniónico con capacidad para lisar las membranas celulares incluida la membrana plasmática, cuyo acceso está protegido por una pared celular funcional en condiciones normales. En su conjunto, estas observaciones confirman que el disrupto de *PdigPMT2* tiene afectada la integridad de su pared celular. Por otro lado, cuando fueron analizados los transformantes PDEH59 y PDEH67 de expresión constitutiva no existieron variaciones en la sensibilidad en ninguno de ellos frente a CFW, CR o SDS (**Figura 64**). Tampoco hubo diferencias en el caso de los transformantes constitutivos de *PdigPMT1* (PDEH8, PDEH9) o *PdigPMT4* (PDEH144, PDEH152) (**Figura 64**).

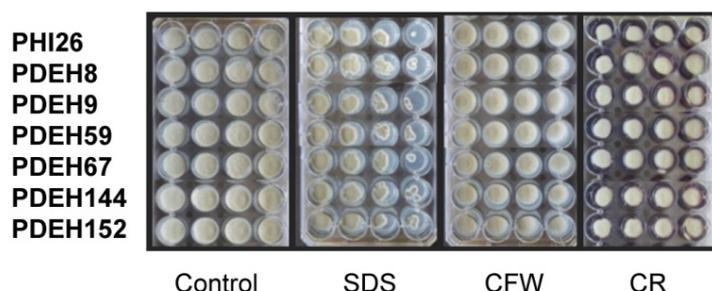


Figura 64. Sensibilidad de transformantes constitutivos (PDEH8, PDEH9, PDEH59, PDEH67, PDEH144, PDEH152) frente distintos compuestos antifúngicos. Se inocularon 5 μ L de diluciones seriadas (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 conidios/mL) de cada cepa fúngica sobre medio PDA (control) y suplementadas con SDS 200 μ g/mL, CFW 150 μ g/mL y CR 150 μ g/mL. Las placas se incubaron a 24 $^{\circ}$ C durante 4 días y se tomaron fotografías representativas de cada tratamiento.

También, se analizó la sensibilidad al estrés oxidativo de los conidios de las cepas transformantes PDEH515, PDEH540, PDEH59, y PDEH67, y con respecto a la cepa silvestre PHI26. PDEH515 mostró una modesta pero reproducible tenue resistencia al estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 (**Figura 65**). Los conidios sembrados de este disrupto de *PdigPMT2* (1×10^5 conidios/mL) fueron capaces de crecer aún a 3 mM de H_2O_2 , mientras que esta concentración resultó letal para el transformante ectópico (PDEH540). En cualquier caso, es evidente que el disrupto PDEH515 no presenta una sensibilidad incrementada al estrés oxidativo sino más bien al contrario. Es interesante destacar el comportamiento diferencial de los dos transformantes de expresión constitutiva de *PdigPMT2* que fueron seleccionados para estos ensayos. PDEH59, el cual tiene múltiples copias del gen (**Figura 56**), resultó ser más claramente sensible a la presencia de ROS que PDEH67 y que cualquiera de las otras cepas ensayadas. Estos resultados indican que la glicosilación de proteínas a través de la función de *PdigPMT2* también parece estar implicada de alguna forma en la respuesta frente al estrés oxidativo y que hay una relación entre la expresión del gen y la sensibilidad a ROS.

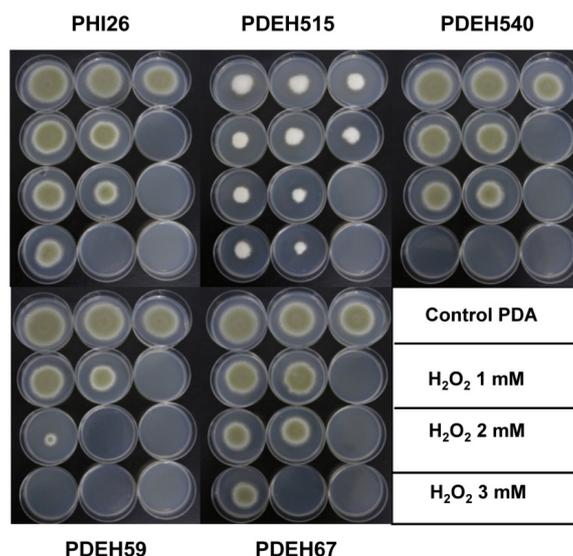


Figura 65. Sensibilidad de distintas cepas transformantes de *P. digitatum* al peróxido de hidrógeno.

Se inocularon 5 μ L de diluciones seriadas (10^5 , 10^4 , 10^3 conidios/mL) de cada cepa fúngica (PHI26, PDEH515, PDEH540, PDEH59, PDEH67) sobre medio PDA (control) y suplementadas con distintas concentraciones de H_2O_2 1-3 mM. Las placas se incubaron a 24 °C durante 4 días y se tomaron fotografías representativas de cada tratamiento.

3.6. Efecto de la disrupción del gen *PdigPMT2* sobre la sensibilidad a PAF26

En esta tesis se ha demostrado que mutantes de O-glicosilación de *S. cerevisiae*, principalmente $\Delta pmt2$, tienen un fenotipo de resistencia incrementada frente al péptido antifúngico PAF26. Por ello, se exploraron la actividad inhibitoria del crecimiento (fungistática) y fungicida de este péptido frente a las cepas transformantes seleccionadas de *P. digitatum*, con énfasis en la sensibilidad de PDEH515.

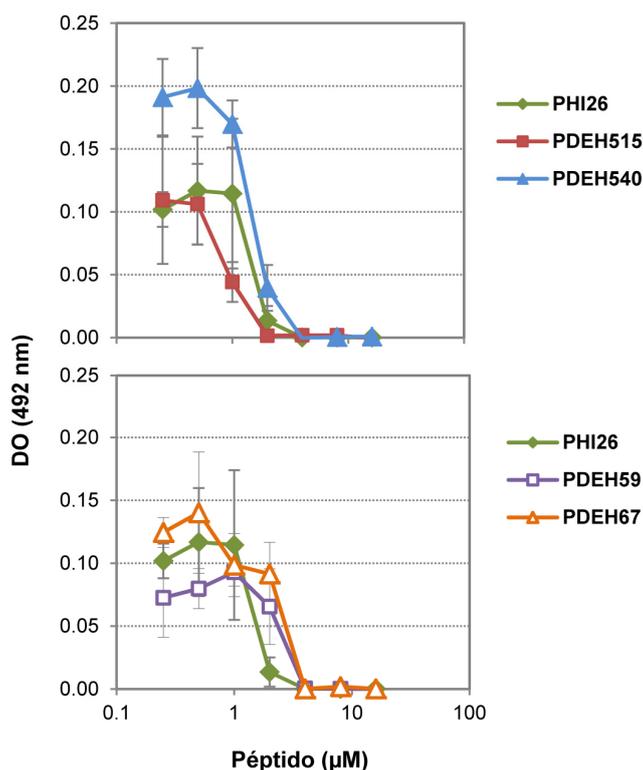


Figura 66. Curvas dosis-respuesta del péptido PAF26 frente a distintas cepas transformantes.

Se representan los valores medios de DO_{492} para cada concentración de péptido después de 72 h de incubación a 24 °C de PHI26 comparado con PDEH515 y PDEH540 (panel superior) ó con los transformantes constitutivos PDEH59 y PDEH67 (panel inferior).

Para evaluar la actividad fungistática de PAF26 se realizaron ensayos en placas de microtítulo en los que se siguió el crecimiento de las cinco cepas analizadas en presencia de concentraciones crecientes del péptido (desde 0,25 a 16 μ M), para obtener las correspondientes curvas dosis-respuesta (**Figura 66**). Después de distintos experimentos independientes, nuestra conclusión fue que ni el disrupto ni las cepas de expresión constitutiva presentaron diferencias significativas de sensibilidad con respecto a la cepa silvestre en este tipo de ensayos, aunque en algún experimento como el mostrado el disrupto PDEH515 fue ligeramente más sensible al péptido. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la capacidad de crecimiento del mutante es menor que la de la cepa silvestre, lo cual

puede enmascarar estos ensayos haciendo a PDEH515 aparentemente más sensible al péptido por su menor vigor de crecimiento. Se ha encontrado que 4 μM de PAF26 fue la concentración completamente inhibitoria en los distintos ensayos realizados y para las cinco cepas analizadas, incluso para los transformantes de expresión constitutiva (PDEH59, PDEH67) (**Figura 66**).

Una propiedad muy significativa de PAF26 es su actividad fungicida sobre conidios no germinados de *P. digitatum*, la cual lo diferencia de otros péptidos. Por ejemplo, PAF26 y melitina tienen una actividad fungiestática muy similar, pero se diferencian en su actividad fungicida que es muy superior en el caso de PAF26 (Muñoz *et al.*, 2006, 2007a). Se llevaron a cabo una serie de experimentos de viabilidad de conidios para poder determinar la actividad fungicida del péptido sobre PDEH515, los otros transformantes (PDEH540, PDEH59, PDEH67) y la cepa PHI26. Para ello, se hicieron los recuentos de colonias viables de cada cepa crecidas en placas de PDA luego de tratarlas con distintas concentraciones péptido PAF26 (4, 16 y 32 μM).

En la **Figura 67A**, se muestra como representativo uno de los dos experimentos independientes realizados, con los porcentajes de viabilidad obtenidos para las muestras incubadas con el péptido en agua estéril, donde se puede observar claramente que PDEH515 fue más resistente a PAF26 en todas las concentraciones de péptido utilizadas. En este sentido, se registró un 82 % de UFC/mL viables de PDEH515 a una concentración de 4 μM (MIC), valor que fue 3 veces más elevado en comparación al dato obtenido para la cepa silvestre (28 % de viabilidad celular). Por otro lado, el comportamiento general de las otras tres cepas PDEH540, PDEH59, y PDEH67 fue muy similar al de la cepa silvestre aunque ésta última fue la más sensible a la actividad fungicida del péptido, ya que no se obtuvo ninguna colonia a concentraciones superiores al valor MIC de 4 μM .

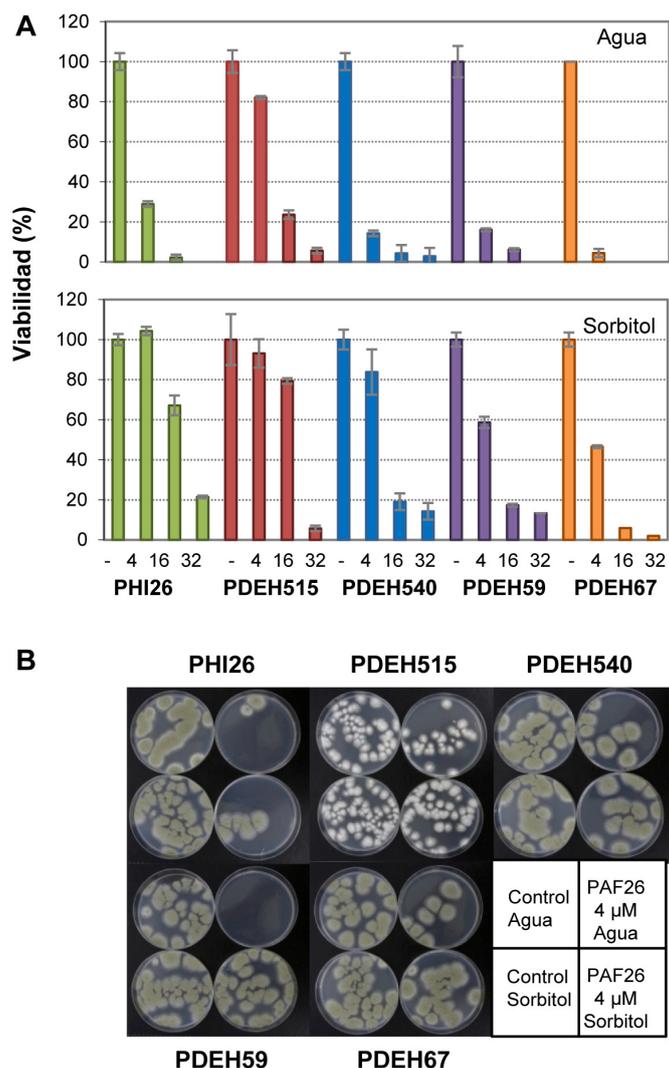


Figura 67. Efecto del péptido PAF26 sobre la viabilidad de los conidios de distintas cepas transformantes.

Se incubaron $2,5 \times 10^4$ conidios/mL de PHI26, PDEH515, PDEH540, PDEH59, PDEH67 en ausencia o presencia de tres concentraciones del péptido PAF26 (4-32 μ M) durante 16 h a temperatura ambiente (A) en agua estéril (panel superior) ó sorbitol 1M (panel inferior). Los datos se representan como valores medios \pm SD de los porcentajes de UFC/mL para cada tratamiento. Se muestran las fotografías representativas del tratamiento con 4 μ M de PAF26 para cada cepa fúngica en las dos condiciones ensayadas (B).

Estos ensayos se hicieron bajo dos condiciones de incubación en paralelo, ya que los conidios también se trataron con el péptido en presencia de sorbitol 1 M. Bajo estas condiciones, se pudo constatar que hubo una disminución muy importante en la toxicidad del péptido sobre los conidios de todas las cepas fúngicas en los tratamientos en presencia de sorbitol, comparados con los tratamientos en agua (**Figura 67**). El efecto protector de la presencia de sorbitol fue menos acusado en PDEH515. Esto dió como resultado unos valores de susceptibilidad de PDEH515 y PHI26 muy similares en presencia de sorbitol, enmascarando la resistencia incrementada del disrupto, comparada con la de la cepa silvestre, en agua.

3.7. El gen *PdigPMT2* está implicado en la virulencia de *P. digitatum*

Finalmente, se investigó el efecto de la disrupción del gen *PdigPMT2* en la virulencia de *P. digitatum* sobre frutos cítricos. Para ello, se realizaron bioensayos bajo condiciones controladas de infección sobre frutos de naranjas variedad Navelina durante la campaña citrícola 2011/2012. Los frutos fueron inoculados con 5 µL de dos concentraciones diferentes de conidios (1×10^4 ó 1×10^5 conidios/mL) según el ensayo realizado. Hay que destacar que normalmente en nuestro laboratorio se utiliza una concentración todavía mayor de 1×10^6 conidios/mL como una condición que produce un desarrollo de la enfermedad muy rápido y uniforme en todas las heridas infectadas, pero que dicha concentración de inóculo no pudo ser alcanzada en este caso debido a la baja producción de conidios de PDEH515.

En la **Figura 68** se muestran los resultados obtenidos en uno de los experimentos realizados a 1×10^4 conidios/mL, una concentración de inóculo considerada baja ya que el progreso de la infección es muy gradual y nunca se alcanza el 100 % de las heridas infectadas. La incidencia de la maceración de tejido fue significativamente más baja en aquellos frutos que fueron inoculados con la cepa PDEH515 durante la duración de todo el experimento. Claramente, como se observa en la **Figura 68A**, el mutante tuvo una severa reducción en los

porcentajes de infección ya que solo aparecieron un 10 % de las heridas infectadas a los 7 dpi. En cambio, con la cepa silvestre PHI26 el número de frutos con síntomas de podredumbre fue en aumento al transcurrir los días posteriores a la inoculación, alcanzando valores de 70 % de heridas infectadas a los 7 dpi. En la **Figura 68B** se muestran los diámetros promedios de las lesiones medidas diariamente para cada una de las cepas evaluadas. Se observa que el tamaño del tejido vegetal macerado fue menor en los frutos inoculados con PDEH515 para cada uno de los tiempos analizados, en comparación a lo que fue observado con PHI26. Los diámetros de las lesiones producidas por PHI26 alcanzaron un valor promedio de 64 mm a los 7 dpi mientras que con PDEH515 se obtuvo al final del ensayo una media de 44 mm. Asimismo, la velocidad de colonización, es decir el aumento del diámetro del área infectada con el tiempo, fue menor en el caso de PDEH515 al menos durante los primeros días de infección.

Finalmente, se observó que no hubo esporulación sobre los frutos infectados con PDEH515 en ninguna de las heridas maceradas, incluso en heridas que alcanzaron más de 4 cm de diámetro (**Figura 68C**), como vemos en las fotografías de tres naranjas representativas de las muestras inoculadas con PHI26 y con PDEH515 a los 5, 6 y 7 dpi (**Figura 68D**). En los frutos infectados con PHI26 predomina la colonización fúngica que se vislumbra por la presencia del micelio blanquecino y la esporulación verde del hongo. Sobre las lesiones producidas en los frutos inoculados con PDEH515 sólo se vislumbraba la maceración y el ablandamiento del tejido.

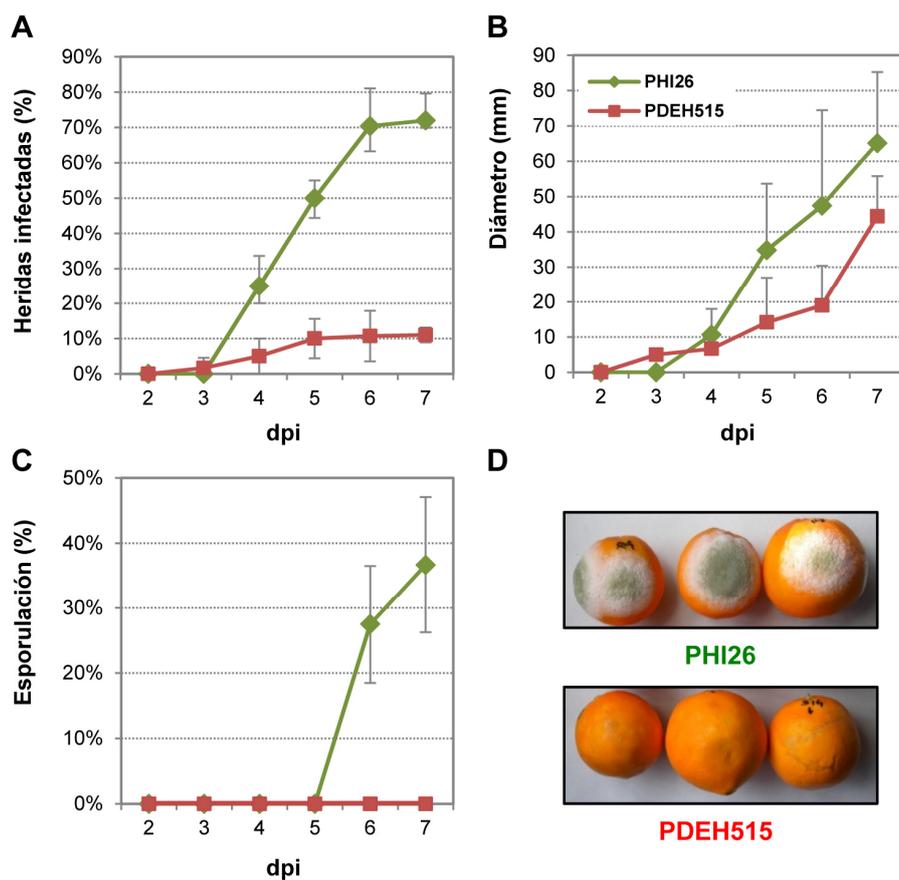


Figura 68. Evolución de la infección producida por PHI26 y PDEH515 sobre frutos de naranja.

Los resultados se representan como valores medios \pm SD de los porcentajes de heridas infectadas (A), de diámetros de las lesiones producidas (B) y de heridas esporuladas (C) para cada cepa fúngica durante 7 dpi. D) Fotografías de tres naranjas representativas de la infección con PHI26 y PDEH515 a 7 dpi. Se inocularon 5 μ L de 1×10^4 conidios/mL de cada cepa fúngica en 15 frutos de naranja (4 heridas/fruto) e incubaron a 24 °C, HR 90 %.

La **Figura 69** muestra un experimento independiente a una concentración de inóculo más alta (1×10^5 conidios/mL) con la que normalmente los controles con la cepa silvestre ya alcanzan el 100 % de infección. En este experimento también se evaluó el fenotipo de la cepa control PDEH540 y de las de expresión constitutiva PDEH59 y PDEH67. Las curvas de evolución de la enfermedad

demuestran nuevamente que PDEH515 produjo un menor número de heridas infectadas en comparación a la cepa silvestre PHI26 y los otros tres transformantes ensayados. No existieron variaciones en el avance de la infección de estos transformantes (PDEH540, PDEGH59, PDEH67) con respecto a PHI26, alcanzando todas valores de 100 % de heridas infectadas a los 7 dpi. La mayor incidencia de infección con PDEH515 (80 %) en comparación al dato obtenido en el ensayo anterior (**Figura 68**) se atribuye a que en esta ocasión se usó una concentración de conidios que fue 10 veces más elevada.

También se confirmó que PDEH515 produjo lesiones y halos de maceración de tejido de menor tamaño sobre los frutos, cuyo diámetro promedio fue de 56 mm al finalizar el experimento (**Figura 69B**). En cambio, en este caso la velocidad de progresión de maceración del área afectada fue muy similar a la de la cepa parental (**Figura 69B**). Además, se evaluó la esporulación sobre los frutos infectados con cada una de las cepas inoculadas (**Figura 69C-D**). Se observa como el micelio del hongo se va extendiendo sobre los frutos con el tiempo hasta que la esporulación característica de color verde cubre completamente todos los frutos infectados con la cepa silvestre PHI26 a 7 dpi. Esta misma apariencia externa, signo de la colonización fúngica también se visualizó en los frutos infectados con los transformantes PDEH540, PDEH59 y PDEH67. Por el contrario, los frutos infectados con PDEH515 no mostraron crecimiento de micelio del hongo o esporulación hasta los 5 dpi. Sin embargo, a 7 dpi se observó esporulación verde en algunos frutos supuestamente infectados con PDEH515 (**Figura 69D**), los cuales sospechamos que fueron contaminados con otras muestras, sobre todo teniendo en cuenta la ya descrita ausencia de esporulación y coloración de conidios en PDEH515. Desgraciadamente, no pudimos confirmar esto último experimentalmente. Todos estos datos permiten concluir que el gen *PdigPMT2* es requerido para la completa virulencia del hongo *P. digitatum* sobre frutos cítricos.

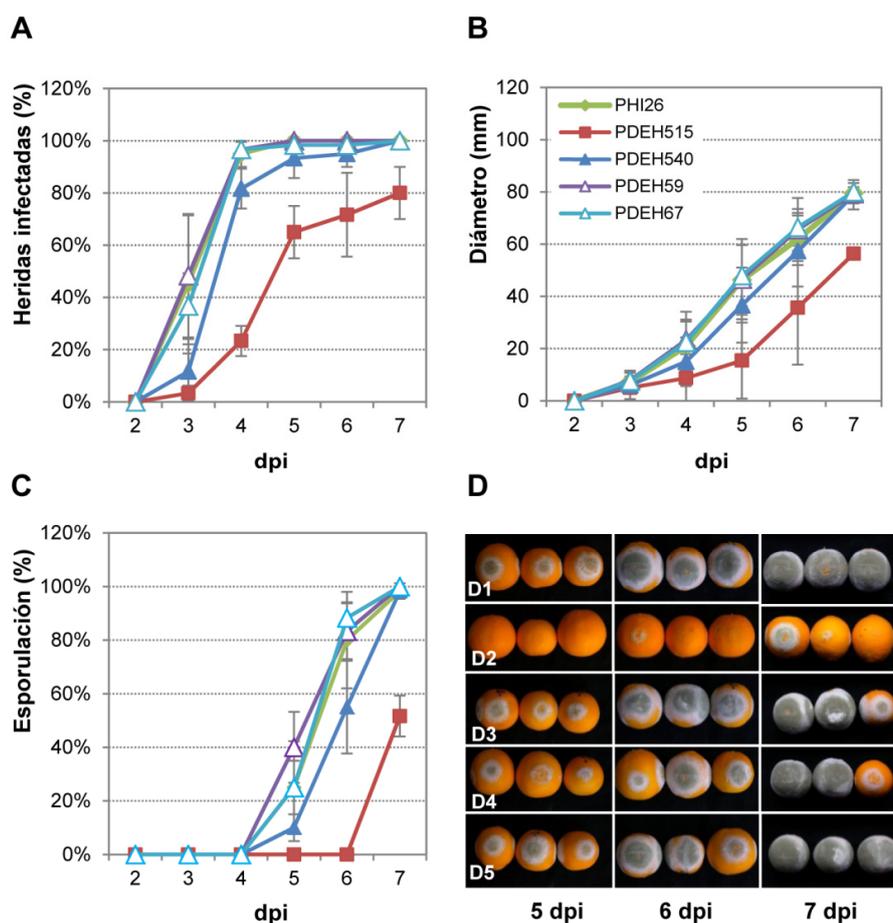


Figura 69. Evolución de la infección producida por distintas cepas transformantes de *P. digitatum* sobre frutos de naranja.

Los resultados se representan como valores medios \pm SD de los porcentajes de heridas infectadas (A), de diámetros de las lesiones producidas (B) y de heridas esporuladas (C) para cada cepa fúngica durante 7 dpi. D) Fotografías de tres naranjas representativas de la infección con PHI26 (D1), PDEH515 (D2), PDEH540 (D3), PDEH59 (D4), PDEH67 (D5) a 5, 6 y 7 dpi. Se inocularon 5 μ L de 1×10^5 conidios/mL de cada cepa fúngica en 15 frutos de naranja (4 heridas/fruto) e incubaron a 24 °C, HR 90 %.

Se hicieron experimentos adicionales para determinar si el balance de la expresión de los genes *PdigPMT1* y *PdigPMT4* se encuentra alterado en el mutante PDEH515 durante la infección sobre frutos cítricos (**Figura 70**). En este ensayo no se detectó expresión de ninguno de los genes *PMT* durante las etapas tempranas

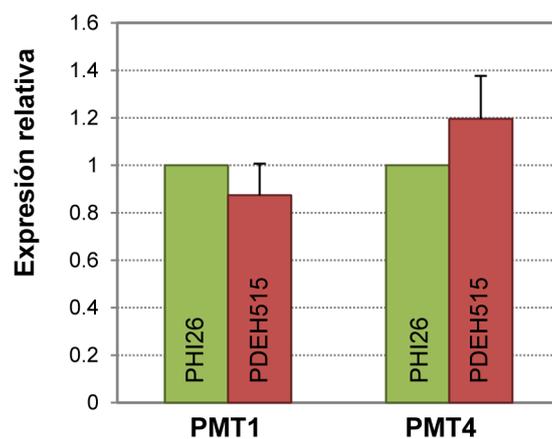
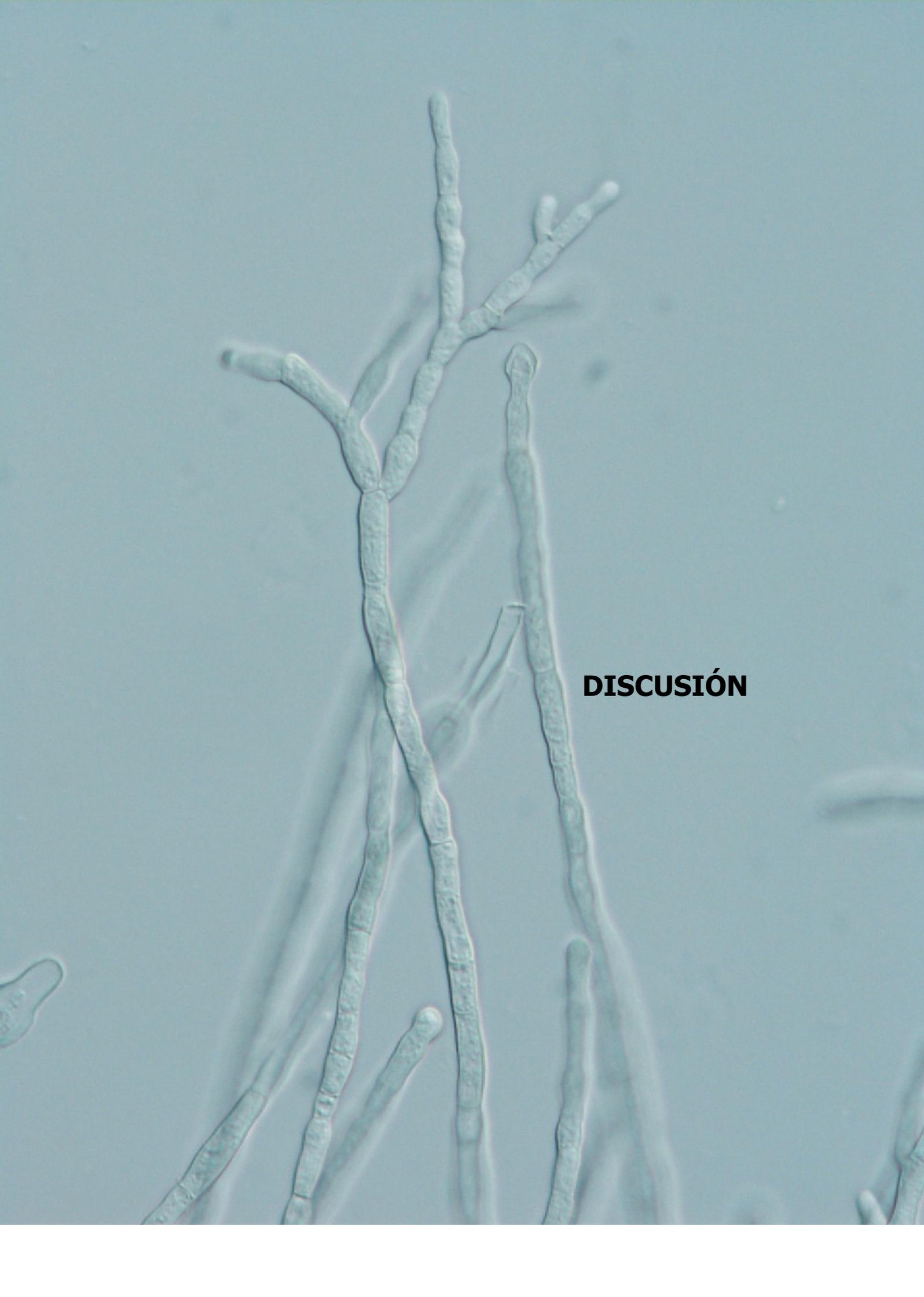


Figura 70. Expresión relativa de los genes *PdigPMT1* y *PdigPMT4* de PHI26 y PDEH515 durante la infección sobre frutos de naranjas.

Se inocularon con 1×10^4 conidios/mL de cada cepa fúngica y se determinaron los niveles de expresión relativa por qRT-PCR, usando como condición control (PHI26 a 7 dpi) y los genes de referencia tubulina y L18.

de infección probablemente como consecuencia de la baja concentración de inóculo en comparación con los ensayos anteriores (**Figura 51**). En estados avanzados (7 dpi) hubo una ligera disminución de la expresión de *PdigPMT1* y un aumento con *PdigPMT4*, aunque estos cambios no fueron claramente significativos comparados a lo detectado en la cepa control (PHI26).



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El conocimiento del mecanismo de acción de un péptido antimicrobiano es de crucial importancia para su potencial aplicación futura y la mejora de sus propiedades antimicrobianas. La mayoría de los estudios realizados en este contexto se han hecho sobre péptidos con actividad antibacteriana, y son muy reducidos en número los estudios sobre péptidos antifúngicos. Esto es probablemente consecuencia de la percepción que se tiene de la importancia de las enfermedades bacterianas sobre la salud humana. Sin embargo, la importancia de las patologías fúngicas sobre la salud humana se ha subestimado de forma alarmante como se pone de manifiesto en estudios recientes (Brown *et al.*, 2012). Alrededor del 25 % de la población mundial (1700 millones de personas) sufrirá durante su vida al menos un episodio de infección superficial en piel, uñas o pelo causada por hongos. Además, el número de infecciones fúngicas de tipo sistémico va en aumento y se manifiestan sobre todo, aunque no únicamente, en pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de tratamientos de quimioterapia contra el cáncer o de prevención de rechazo en trasplantes así como en pacientes con enfermedades como el SIDA. Se estima que el número de muertes anuales como consecuencia de una infección fúngica es equivalente al causado por la tuberculosis o malaria (Brown *et al.*, 2012). Esta problemática se agrava por la escasez de tratamientos y moléculas antifúngicas eficaces. Por otro lado, los hongos son los principales agentes causales de enfermedades en los cultivos y responsables de importantes pérdidas de la producción total (Agrios, 2004). Dentro del ámbito de la conservación postcosecha, las pérdidas que se producen por podredumbres fúngicas de frutas y vegetales en fresco (Narayanasamy, 2006) o por contaminación con micotoxinas (Magan y Aldred, 2007) son si cabe aún más importantes aunque difíciles de cuantificar globalmente. Por tanto, los hongos también representan una amenaza importante para la seguridad alimentaria. Finalmente, la emergencia de nuevas enfermedades fúngicas tanto en plantas como en animales es un grave problema que afecta la sostenibilidad y la biodiversidad global (Fisher *et al.*, 2012). La búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas resulta prioritaria por la falta de compuestos o drogas eficientes para

el control de infecciones fúngicas y además por la creciente generación de resistencia a los tratamientos antifúngicos actuales (Brown *et al.*, 2012). Es en este contexto en el que está adquiriendo importancia en los últimos años el estudio de péptidos con propiedades antifúngicas.

El péptido PAF26 es un excelente modelo para profundizar en el estudio del modo de acción de péptidos antifúngicos (Muñoz *et al.*, 2012). Como hemos visto en la Introducción, PAF26 es un péptido que presenta actividad antifúngica y capacidad de internalización celular en una secuencia de únicamente seis aminoácidos. Muy recientemente, y en un estudio paralelo al realizado en esta tesis, se ha caracterizado el proceso de interacción e internalización de PAF26 en el hongo filamentoso modelo *N. crassa* mediante el uso de sondas fluorescentes, microscopía confocal láser, y caracterización de mutantes en genes específicos (Muñoz *et al.*, 2012). Se comprobó que el péptido a bajas concentraciones (0,5 μM) en primer lugar interacciona con las envueltas celulares, seguidamente se internaliza vía endocitosis, luego se acumula en las vacuolas y finalmente se libera activamente hacia el citosol causando la muerte celular. En los mutantes $\Delta rvs-161$, $\Delta rvs-167$, $\Delta rab-5$ involucrados en el proceso de endocitosis dependiente de clatrina, hubo una reducción en la internalización y la actividad fungicida de PAF26. También se demostró que la internalización es un proceso dependiente de energía y mediado por la polimerización de actina, lo cual es consistente con la implicación de rutas endocíticas. El péptido afecta la homeostasis de calcio, incrementando los niveles de calcio intracelular. Como ocurre con muchos AMP, se demostró que PAF26 induce la depolarización de membrana plasmática de *Neurospora*, aunque este efecto no se correlaciona con la muerte celular. Todos estos datos son consistentes con un mecanismo de muerte intracelular determinado por la internalización de PAF26, y que no se basa en la permeabilización de la membrana plasmática como mecanismo primario de acción. Por otro lado, el péptido a elevadas concentraciones ($>20 \mu\text{M}$) se translocó de forma pasiva a través de la membrana plasmática provocando la muerte celular por un mecanismo no dependiente de endocitosis.

1. Mecanismo de acción de PAF26. Importancia de la pared celular y la glicosilación de proteínas en la interacción y actividad del péptido

1.1. El mecanismo de acción de PAF26 presenta al menos tres etapas secuenciales

En esta tesis, se ha caracterizado la interacción de PAF26 con la levadura modelo *S. cerevisiae* utilizando el péptido marcado fluorescentemente y microscopía confocal láser (**Figura 20**). El péptido TMR-PAF26 a concentraciones sub-inhedorias (2,5 μ M) se detecta en primer lugar asociado con las envueltas celulares de la levadura. Aunque no hemos realizado estudios detallados, la hipótesis es que el péptido interaccionaría primero con las capas más expuestas de la pared celular y luego, y por analogía con lo que ocurre en *N. crassa*, difundiría a través de la pared celular y llegaría hasta la membrana plasmática. Seguidamente, el péptido se internaliza y localiza en estructuras vacuolares, que progresivamente crecen en tamaño y se fusionan hasta convertirse en una gran vacuola central marcada fluorescentemente. Luego el péptido en respuesta de un gradiente de concentración se transporta activamente hacia el citoplasma quedando la vacuola vacía. Finalmente, se permeabiliza la membrana de la vacuola y el péptido marcado fluorescentemente ocupa todo el espacio intracelular. Esta última etapa también coincidiría con la de *N. crassa*, en donde la detección del péptido en todo el espacio intracelular se produce a la vez que la muerte de las células fúngicas. Se han descrito patrones similares de localización intracelular con la interacción del péptido antimicrobiano dermaseptina DsS3(1-16) en *C. albicans* (Harris *et al.*, 2009). Se ha encontrado que esta dermaseptina se une con las envueltas celulares, luego se localiza en vacuolas y finalmente ocupa todo el citoplasma (Harris *et al.*, 2009). La histatina 5 también se internaliza en células de *C. albicans* vía endocitosis a bajas concentraciones ocupando las vacuolas, mientras que a elevadas concentraciones del péptido existe un transporte pasivo (Mochon y Liu, 2008; Jang *et al.*, 2010). La localización de la histatina 5 en vacuolas provoca la expansión de las mismas y posteriormente la localización del péptido en el citoplasma (Jang *et al.*, 2010), de forma similar a nuestras observaciones con PAF26 en levadura y *N. crassa* (**Figura 20** y **Figura 71**). Además, se comprobó que

la localización intracelular de histatina 5 en vacuolas o citoplasma es dependiente de la concentración inicial del péptido y el tiempo de exposición (Mochon y Liu, 2008). Estos datos indican que para causar la muerte de las células fúngicas, PAF26 y también histatina 5, requieren alcanzar una concentración crítica dentro de las células.

Previamente, en nuestro grupo se había determinado la importancia de cada aminoácido sobre la actividad antimicrobiana de PAF26 a través de la sustitución por residuos de alanina en su secuencia peptídica (Muñoz *et al.*, 2007b). Este estudio permitió comprobar que cada residuo aminoacídico contribuye individualmente a la completa actividad antifúngica del hexapéptido sobre *P. digitatum*, aunque los aminoácidos catiónicos (Arg, Lys) fueron cuantitativamente más importantes que los residuos aromáticos (Trp, Phe). Hemos diseñado dos nuevos hexapéptidos derivados de PAF26 (PAF95 y PAF96) por la sustitución con tres residuos neutros de alanina del dominio catiónico (RKK) o hidrofóbico (WFW), respectivamente. En esta tesis se determinó que ambos dominios son necesarios para la actividad antifúngica de PAF26 sobre la levadura *S. cerevisiae* (**Figura 21**), de forma similar a lo encontrado en distintos hongos filamentosos como *N. crassa*, *A. fumigatus* y *P. digitatum*, en los que PAF95 o PAF96 tampoco fueron activos (datos no mostrados en esta tesis). Estos datos demuestran que los dos dominios (catiónico e hidrofóbico) son necesarios para la toxicidad de PAF26 sobre las células fúngicas. Además, el estudio por microscopía de la interacción de estos péptidos con *S. cerevisiae* permitió constatar importantes diferencias con respecto a lo descrito previamente con TMR-PAF26. El péptido TMR-PAF95 no interaccionó con las células de levadura, mientras que TMR-PAF96 permaneció unido a las envueltas celulares (**Figura 21C-D** y **Figura 71**).

Los mismos patrones de interacción de TMR-PAF95 y TMR-PAF96 sobre *S. cerevisiae* también se han encontrado con los hongos *A. fumigatus* y *P. digitatum*. Sí que se observó un comportamiento diferente y significativo en el caso de TMR-PAF95 actuando sobre *N. crassa*, ya que a diferencia de lo caracterizado con las otras especies fúngicas, este péptido, aunque no presentó

actividad, se internalizó y apareció localizado dentro de las vacuolas, sin progresar hacia el citoplasma (ver **Figura 71**). Se ha descrito que la carga catiónica es una de las principales propiedades fisicoquímicas que resulta crítica para la actividad de péptidos antimicrobianos ya que permite la interacción con las envueltas celulares cargadas negativamente de los microorganismos (Brogden, 2005; Brown y Hancock, 2006; Yount y Yeaman, 2006; Marcos y Gandía, 2009; Nicolas y El Amri, 2009). Esto se ha corroborado con el péptido TMR-PAF95 en el que la falta de carga catiónica impidió su interacción con la mayoría de hongos evaluados (*S. cerevisiae*, *A. fumigatus* y *P. digitatum*). Pero la diferencia observada con TMR-PAF95 en *N. crassa* sugiere además la existencia de factores en sus envueltas celulares que permitan la interacción, penetración y transporte de este péptido no catiónico a la vacuola, a pesar de que sea mucho menos activo que PAF26. Estos factores (de pared celular) aun no caracterizados que determinen la interacción con PAF95 podrían: 1) interactuar con residuos aromáticos (triptófano y fenilalanina) en el dominio hidrofóbico de PAF26 y PAF95, y 2) estar relacionado con la mayor sensibilidad de *N. crassa* a PAF26, si se compara con otros hongos.

Es interesante resaltar que el péptido TMR-PAF96 permaneció unido a las envueltas celulares de *S. cerevisiae* y que su comportamiento fue similar en todos los hongos analizados (*A. fumigatus*, *P. digitatum* y *N. crassa*). Estas observaciones demuestran que el dominio catiónico es suficiente para la interacción de PAF26 con las envueltas de las células fúngicas. Teniendo en cuenta además la falta de actividad antifúngica de PAF96 podemos concluir que PAF26 no ejerce su acción antifúngica a nivel de la superficie celular (pared celular y/o membrana), aunque esta sería necesaria para su interacción inicial y por tanto acción (ver más adelante).

PAF96 carece del dominio hidrofóbico C-terminal (WFW). En estudios previos, ya se había reconocido la importancia de los residuos de triptófano para la actividad antibacteriana de AMP (Strom *et al.*, 2000) y demostrado que promueven la interacción con micelas lipídicas, que se consideran modelos de membranas biológicas (Schibli *et al.*, 1999). Recientemente, la adición de motivos triptófano/fenilalanina a AMPs cortos y catiónicos incrementó su actividad

bactericida (Pasupuleti *et al.*, 2009) y además aumento su selectividad disminuyendo la toxicidad sobre células epiteliales y glóbulos rojos (Schmidtchen *et al.*, 2011). Nuestro grupo había demostrado previamente que PAF26 no causa hemólisis y tiene toxicidad baja sobre células humanas en cultivos celulares (López-García *et al.*, 2007). Nuestras investigaciones revelan que los residuos de triptófano están involucrados en la internalización de esta clase de AMPs sobre las células fúngicas. En nuestro estudio previo, se había demostrado que la sustitución de fenilalanina en la posición cinco de PAF26 por alanina no afectó significativamente su actividad antifúngica (Muñoz *et al.*, 2007b). Este resultado indica que la fenilalanina no tiene un papel en la internalización/actividad del péptido y por tanto apunta al triptófano como el residuo crítico necesario para la penetración de PAF26 dentro de los hongos. La falta de actividad antimicrobiana de análogos de otros AMP se ha relacionado con su incapacidad de penetrar dentro de las células, como en el caso de péptidos derivados de buforina II en *E. coli* (Park *et al.*, 2000), histatina 5 en *C. albicans* (Jang *et al.*, 2008) y Sub5 en *A. nidulans* (Mania *et al.*, 2010). De estos ejemplos, sólo Sub5 contiene residuos de triptófano, aunque las sustituciones de aminoácidos ensayadas implicaban residuos de triptófano pero también de arginina, lisina y valina, y por tanto no fue posible asignar el fenotipo observado con algún cambio específico de residuo aminoacídico.

El análisis secuencial de la interacción de PAF26 con *S. cerevisiae* y de la actividad y localización de los péptidos derivados PAF95 y PAF96, junto con los resultados paralelos obtenidos con *N. crassa*, han permitido determinar que existen al menos tres etapas en el mecanismo de acción antifúngica del péptido PAF26 (**Figura 71**). Estas serían la interacción inicial con las envueltas celulares más externas (pared celular) mediada fundamentalmente por residuos catiónicos del péptido, la internalización que en *N. crassa* y a bajas concentraciones de péptido se realiza por endocitosis dependiente de clatrina y está mediada por los residuos de triptófano del péptido, y finalmente el mecanismo de muerte intracelular. Estas etapas serían cada una necesarias pero no suficientes por si mismas para la acción antifúngica.

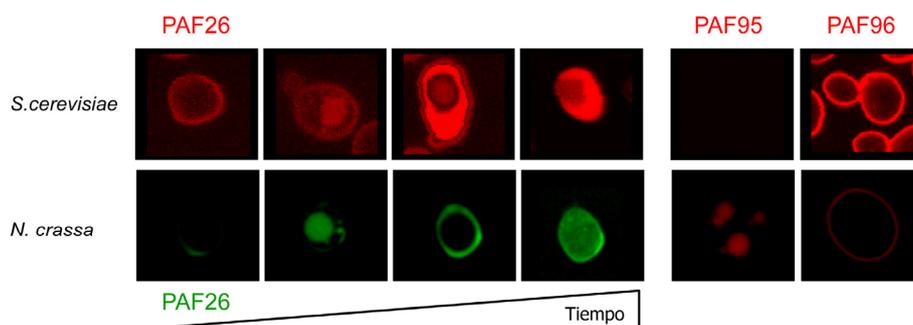


Figura 71. Localización de los péptidos PAF26, PAF95 y PAF96 marcados fluorescentemente en *S. cerevisiae* y *N. crassa* con microscopía confocal láser.

Se muestran fotografías representativas de la interacción e internalización de TMR-PAF26 (rojo) en *S. cerevisiae* (panel superior) y FITC-PAF26 (verde) en *N. crassa* (panel inferior, adaptado de Muñoz *et al.*, 2012), y de la localización diferencial de TMR-PAF95 y TMR-PAF96 en ambos hongos. La internalización del péptido PAF26 provoca una expansión vacuolar de las células, seguida del transporte activo del péptido al citoplasma, lo que coincide con muerte celular. PAF95 no interacciona con levadura, mientras que se localiza en las vacuolas de *N. crassa* y PAF96 permanece unido a las envueltas celulares de las dos especies fúngicas.

1.2. Importancia de la pared celular en el mecanismo de acción de PAF26

La pared celular es la primera estructura con la que estos AMP interaccionan en la primera etapa de su mecanismo. Se ha constatado que las diferencias existentes entre distintos microorganismos y con células de organismos superiores en cuanto a la composición de su pared celular están relacionadas con la toxicidad selectiva de AMP (Yeaman y Yount, 2003). En esta tesis se ha demostrado que la degradación enzimática de la pared celular bloquea completamente la internalización de PAF26 en los protoplastos de la cepa parental de levadura (BY4741) (**Figura 26C**) y disminuye la muerte celular (**Figura 27**). Estos datos demuestran que se requiere una pared celular funcional para la internalización de PAF26 y por tanto para su toxicidad sobre *S. cerevisiae*. La pared celular también es necesaria para la actividad antifúngica de defensinas vegetales como Pn-AMP1 en levaduras (Koo *et al.*, 2004) y NaD1 en el hongo filamentoso

F. oxysporum (van der Weerden *et al.*, 2010); aunque, a diferencia de nuestros resultados, la falta de pared celular en estas investigaciones impide la unión de ambas defensinas a las células fúngicas, protegiéndolas de su toxicidad. Aunque en nuestro caso no hemos podido cuantificar y comparar la unión de TMR-PAF26 en células con pared y protoplastos, las imágenes recogidas (**Figura 26A** y C) indican que la cantidad de péptido localizado en las envueltas celulares es muy similar en ambos casos. Por tanto, en el caso de PAF26, y a diferencia de Pn-AMP1 o NaD1, el péptido (o al menos una cantidad apreciable del mismo) sí que se une a células sin pared, pero no se internaliza, impidiendo su acción antifúngica.

Por otro lado, el análisis de la interacción de TMR-PAF26 sobre tres cepas deletantes ($\Delta ecm33$, $\Delta arg1$, $\Delta ipt1$) permitió completar la caracterización de los fenotipos previamente identificados en un análisis global del modo de acción de PAF26 sobre *S. cerevisiae* (**Figura 22**) (López-García *et al.*, 2010a). Como se ha detallado en la Introducción, el estudio transcriptómico previo había revelado la inducción de la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales de la pared celular como una respuesta general de la levadura a la exposición de PAF26 y el péptido citolítico melitina (López-García *et al.*, 2010a). Los porcentajes obtenidos de células teñidas completamente con péptido se han podido correlacionar con las diferencias de sensibilidad frente a PAF26 en los mutantes $\Delta ecm33$ y $\Delta arg1$ (**Figura 17** y **Figura 22**). La mayor sensibilidad de $\Delta ecm33$ frente a PAF26 (López-García *et al.*, 2010a), se correlacionó con el incremento de células teñidas con el péptido marcado y fluorescencia en todo el citoplasma (**Figura 23**). Ecm33p es una proteína estructural y glicosilada de pared celular relacionada con la activación de la ruta de integridad de pared celular (CWI), aunque su función molecular aún es desconocida (Pardo *et al.*, 2004). En un estudio previo también se ha descrito que la eliminación de otros genes estructurales de pared celular en *S. cerevisiae* confirieron una mayor sensibilidad frente a distintos AMP (Morton *et al.*, 2007b). Entre estos mutantes se encuentran las cepas deletantes $\Delta gas1$ y $\Delta ecm19$ que fueron más sensibles al péptido dermaseptina DsS3(1-16) (Morton *et al.*, 2007b). Gas1p codifica para una β -1,3-glucanosiltransferasa con unión GPI a la membrana de la pared celular (Ram *et al.*, 1998) y Ecm19p es una proteína de pared de función desconocida (Lussier *et al.*, 1997). Además, existen

investigaciones que han demostrado que las levaduras se adaptan a distintos AMP mediante la activación de las cascadas MAP quinasas involucradas en el mantenimiento de la integridad y fortalecimiento de la pared celular (Gamberi *et al.*, 2007; Vylkova *et al.*, 2007b). Esto sugiere que la pared celular también actúa como un mecanismo de defensa/protector frente al efecto letal de los péptidos. En este sentido, la pared celular fúngica tendría una doble funcionalidad en el mecanismo de acción de PAF26, siendo necesaria no sólo para la internalización del péptido que es un factor clave para ejercer su toxicidad efectiva sino también para proteger a las células a través de su refortalecimiento.

1.3. La glicosilación de proteínas determina la actividad antifúngica de PAF26.

Muchas proteínas de la pared celular fúngica están muy glicosiladas, como lo confirman nuestros análisis *in silico* (datos no mostrados). Por ejemplo, Ecm33p tiene en sus 429 aminoácidos, 3 sitios potenciales de N-glicosilación y un número elevado de sitios de O-glicosilación, ubicados en sus extremos. Como se ha mencionado en la Introducción, la glicosilación de proteínas es un proceso biológico fundamental que determina el correcto plegamiento y función de una fracción importante de las proteínas de un organismo. En *S. cerevisiae* y otros hongos, la glicosilación de proteínas es esencial para el mantenimiento de la estructura y rigidez de su pared celular (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). En nuestro grupo se han identificado una serie de mutantes en genes involucrados en el proceso de glicosilación en *S. cerevisiae* que mostraron una mayor resistencia a PAF26 (Gandía y Marcos, datos no mostrados). Entre estos se incluyen los seis genes *PMT* de O-glicosilación (*PMT1-6*), genes de N-glicosilación como *EOS1* y *ALG5*, así como también *MNN1*, *MNN4*, *MNN5* (**Figura 18**). Estos genes participan en la adición de monosacáridos en dos procesos distintos durante la síntesis y formación de la estructura de los glicanos (ver también Introducción): 1) en la zona de unión de los glicanos a los residuos de aminoácidos (ej. genes *PMT* o *EOS1*) o 2) en las cadenas de manosas que decoran la parte más externa de los N- y O-glicanos (**Figura 72**). Estos resultados indican que la glicosilación de

proteínas es necesaria para la susceptibilidad de la levadura frente a la acción fungicida del péptido PAF26.

Distintos estudios previos también han demostrado que mutaciones en genes de glicosilación de proteínas incrementan la resistencia frente a varios péptidos y proteínas antimicrobianas. Por ejemplo, mutantes del complejo de manosiltransferasas en el Golgi (Mnn10p, Mnn11p, and Hoc1p) (**Figura 72**) fueron resistentes a la defensina Pn-AMP1 (Koo *et al.*, 2004). También los mutantes $\Delta mnn2$, $\Delta mnn4$ y $\Delta mnn6$ de *S. cerevisiae* mostraron una mayor resistencia a la osmotina y, además, sus células unieron menos osmotina por la falta de fosfomananos en su pared celular (Ibeas *et al.*, 2000). La eliminación de *MNN1* resultó en una mayor sensibilidad a la osmotina debido en este caso a una mayor unión del péptido a los fosfomananos (con carga negativa) que quedaron más expuestos (Ibeas *et al.*, 2000). Consistentemente, la pérdida de manosilfosfato en el hongo patógeno *C. albicans* a través de la disrupción de *MNN4* resultó en una mayor resistencia y una reducción en la unión del péptido dermaseptina DsS3(1 16) (Harris *et al.*, 2009). También en *C. albicans*, el mutante $\Delta mnn5$ fue resistente a la actividad fungicida de lactoferrina (Bai *et al.*, 2006). Los mutantes de *S. cerevisiae* en genes de N-glicosilación como *STT3*, cuya proteína codificada forma parte del complejo de oligosacariltransferasas (OST), y *ALG3* también mostraron resistencia frente a toxina "killer" HM-1 (Kimura *et al.*, 1999). Mutantes en genes *PMT* también son más resistentes a la toxina "killer" K1 que actúa sobre los glucanos de la pared celular (Lussier *et al.*, 1995; Gentzsch y Tanner, 1996). En conclusión, todos estos estudios independientes confirman que la glicosilación de proteínas se requiere para la actividad antifúngica de un gran número de proteínas y péptidos antimicrobianos.

Markovich *et al.*, 2004), aunque este gen en concreto pasó desapercibido en ambos casos. Además, el mutante de Eos1p tiene un fenotipo pleiotrópico que se caracteriza por una mayor sensibilidad al estrés osmótico y oxidativo, así como la alteración de la homeostasis de metales (Nakamura *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2010). Otro de los fenotipos interesantes de $\Delta eos1$ es la mayor tolerancia a tunicamicina, un compuesto inhibidor de N-glicosilación (datos no mostrados) (Nakamura *et al.*, 2007). Este resultado, junto con la glicosilación anómala de proteínas de $\Delta eos1$ y la localización de Eos1p a nivel del retículo endoplasmático justificó su anotación funcional dentro de N-glicosilación (Nakamura *et al.*, 2007). La tunicamicina es un compuesto que inhibe la primera reacción del proceso de N-glicosilación que es catalizada por Alg7p (**Figura 72**). La eliminación de *ALG7* es letal, y por lo tanto no pudo ser ensayada en nuestros experimentos. Dado que la ausencia de Eos1p resulta en un incremento de resistencia a tunicamicina, nosotros nos aventuramos a proponer que Eos1p actúa en la misma etapa que Alg7p y que es necesario para la N-glicosilación de una subpoblación de proteínas (**Figura 72**). Por tanto, los genes *PMT* y *EOS1* estarían interviniendo en la incorporación del primer monosacárido de los O- y N-glicanos, respectivamente, y esa es una segunda razón que nos llevó a estudiarlos con más detalle en esta tesis.

Se ha confirmado que los mutantes $\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$ de *S. cerevisiae* fueron menos susceptibles a la actividad fungicida del péptido PAF26 e incluso, aunque de forma menos evidente, al péptido sintético P113 derivado de histatina 5 (**Figura 19**). Por el contrario, estos mutantes fueron más sensibles frente a AMP que actúan sobre las membranas celulares, como el péptido lítico melitina o la cecropina A (**Figura 19** y **Tabla 14**). Se sabe que los mutantes en genes de glicosilación se caracterizan por una mayor susceptibilidad general a agentes antifúngicos, una lenta velocidad de crecimiento y fenotipos relacionados con defectos en la pared celular (Gentzsch y Tanner, 1997; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). La elevada sensibilidad a CFW y SDS (**Figura 18**) confirma que $\Delta pmt2$ y $\Delta eos1$ tienen una pared celular debilitada y comprometida que debería aumentar su sensibilidad frente a agentes antifúngicos y péptidos que actuaran sobre la membrana plasmática, como son melitina y cecropina A. Sin embargo, cabe

resaltar que la resistencia de estos mutantes al hexapéptido PAF26 es significativa y específica, reproduciéndose sólo en el caso de P113, que es un fragmento activo de la histatina 5, otro péptido antifúngico del tipo penetratina.

Se ha demostrado que existe una localización diferencial del péptido marcado (TMR-PAF26) en las células del mutante $\Delta eos1$, ya que no fue internalizado en ellas y permaneció predominantemente en las envueltas celulares (**Figura 25**). Esto se correlacionó con una reducción en sus porcentajes de muerte celular (**Figura 27**), confirmando la resistencia descrita en los ensayos fungicidas previos (**Figura 19**). El fenotipo de este mutante mimetiza, por tanto, los resultados antes mencionados con protoplastos. En su conjunto, estos resultados demuestran que la actividad de Eos1p y la presencia de pared celular son necesarias para la internalización de este péptido, y por tanto para su actividad antifúngica. En estudios previos se ha demostrado una buena correlación entre una mayor resistencia de mutantes de *S. cerevisiae* en genes de glicosilación y una menor unión de la dermaseptina DsS3(1-16) a las células, determinada también con el péptido marcado fluorescentemente (Harris *et al.*, 2009). La ausencia de grupos manosilfosfatos en la pared celular provocada por la delección de los genes *MNN2*, *MNN4* y *MNN6* en *S. cerevisiae* también disminuye la unión a osmotina e incrementa la resistencia a esta proteína antifúngica (Ibeas *et al.*, 2000). De forma similar, nuestro grupo había comprobado que la mayor sensibilidad de mutantes de proteínas de pared celular como Ecm33p y Ssd1p se correlaciona con una mayor unión de PAF26 marcado fluorescentemente determinada por citometría de flujo (López-García *et al.*, 2010a). En nuestro grupo hemos comprobado que la mutación de *EOS1* no afecta significativamente a la cantidad de PAF26 que se une a células de levadura (Carmona y Marcos, datos no mostrados), tal y como sugieren las imágenes de microscopía (**Figura 25**).

Por otro lado, la localización de TMR-PAF26 (**Figura 26**) y su actividad fungicida (**Figura 27**) fue similar en los protoplastos de BY4741 y $\Delta eos1$, demostrando que el fenotipo de $\Delta eos1$ se pierde en protoplastos. Un resultado similar ocurre en el mutante de glicosilación $\Delta mnn4$ de *S. cerevisiae*, resistente a osmotina, y cuyo fenotipo se pierde en células desprovistas de pared celular (Ibeas

et al., 2000). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que al menos parte de la función de Eos1p se manifiesta en la pared celular fúngica, probablemente a través de la glicosilación de una serie de proteínas (de pared) que serían necesarias para la internalización celular de PAF26, según un modelo teórico que aparece en la **Figura 73**. Se ha descrito que la actividad antifúngica de la histatina 5 sobre *C. albicans* está mediada por las proteínas Ssa1/2p, chaperonas del tipo Hsp70 que se localizan en pared y que son necesarias para la internalización del péptido (Sun *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2010) (**Figura 73**). Las proteínas Ssa1/2p de *S. cerevisiae* presentan sitios potenciales de N-glicosilación (análisis *in silico* no mostrados). En esta tesis no hemos podido determinar la relevancia de *SSA1/2* en la actividad antifúngica de PAF26. Una colaboración con el Dr. Severino Zara de la Universidad de Sassari (Italia) nos ha permitido demostrar que deletantes en el gen *FLO11* de una levadura vínica de velo de flor pierden la capacidad de unión al péptido PAF26 (manuscrito en evaluación). Flo11p es una proteína de pared hiperglicosilada del tipo mucina que está implicada en adhesión intercelular y la formación de biofilm (Zara *et al.*, 2005). Por otra parte, Msb2p, una proteína transmembrana de pared celular que está glicosilada por Pmt1p y además actúa como sensora, se ha relacionado con la actividad de histatina 5 y LL-37 sobre *C. albicans* (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Mutantes en el gen correspondiente son más susceptibles a LL-37, y el dominio extracelular e hiperglicosilado de Msb2p secretado al medio actúa como protector de la acción de estos AMP, probablemente secuestrándolos e impidiendo su acceso a las células (**Figura 73**). Varias investigaciones han demostrado que Msb2p es glicosilada por Pmt4p en *S. cerevisiae* (Yang *et al.*, 2009) y *U. maydis* (Fernández-Álvarez *et al.*, 2012), y es un factor de virulencia en distintos hongos fitopatógenos (Pérez-Nadales y Di Pietro, 2011; Fernández-Álvarez *et al.*, 2012). La identificación de proteínas glicosiladas de pared celular que estén implicadas en la internalización y actividad antifúngica de PAF26 se planea explorar en el futuro. Un abordaje experimental sería identificar qué proteínas tienen una glicosilación alterada en el mutante $\Delta eos1$, y seguidamente comprobar si los correspondientes mutantes internalizan o no el péptido. En cualquier caso, el carácter pleiotrópico del mutante $\Delta eos1$ (Nakamura *et al.*, 2007) hace que no podamos descartar la existencia de

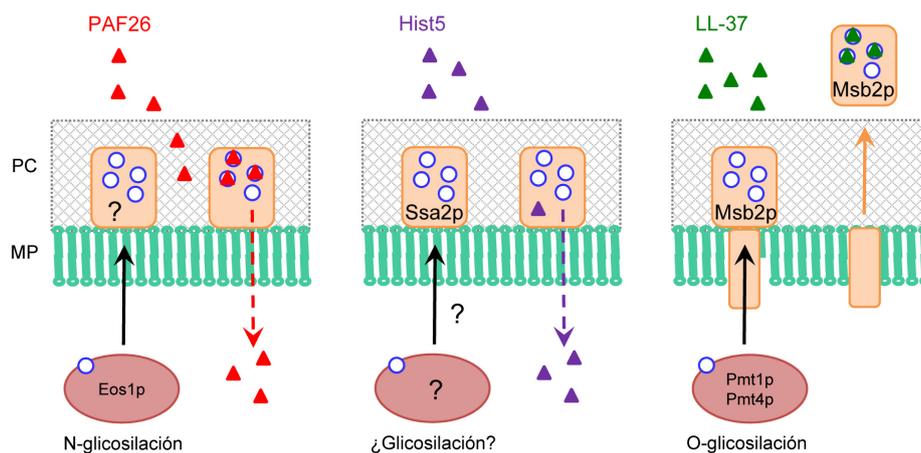


Figura 73. Modelos teóricos de la implicación de proteínas glicosiladas como determinantes en la actividad de péptidos antimicrobianos.

Se muestra la posible función de Eos1p frente a la acción antifúngica de PAF26 (panel izquierdo) y en comparativa con el mecanismo de acción descrito para los péptidos histatina 5 (panel central, adaptado de Sun *et al.*, 2008) y LL-37 (panel derecho, adaptado de Szafranski-Schneider *et al.*, 2012).

otros posibles mecanismos moleculares que expliquen la resistencia de este mutante a PAF26 y otros péptidos antifúngicos tipo penetratina.

Nuestro grupo también ha observado que las actividades de PAF26 y tunicamicina son sinérgicas (Gandía y Marcos, datos no publicados). La tunicamicina es un agente antifúngico que inhibe la N-glicosilación (Nakamura *et al.*, 2007). Este efecto sinérgico es indicativo de que aunque la glicosilación de proteínas determina la sensibilidad al péptido, la diana antifúngica de PAF26 no es el proceso de glicosilación de proteínas en sí mismo. Algunos datos previos son consistentes con esta observación. La inhibición farmacológica o genética del proceso de glicosilación resulta en la activación de la ruta de integridad de la pared celular y en la inducción de la respuesta de proteínas mal plegadas (Reinoso-Martin *et al.*, 2003; Cantero *et al.*, 2007; Arroyo *et al.*, 2011; Cantero y Ernst, 2011). Además, la inhibición de la N-glicosilación mediada por tunicamicina desencadena la activación de los genes *PMT* sugiriendo un mecanismo compensatorio para aliviar los defectos de glicosilación de proteínas (Travers *et al.*,

2000). Sin embargo, el análisis transcriptómico de células de *S. cerevisiae* tratadas con PAF26 no identificó ninguno de estos procesos o respuestas (López-García *et al.*, 2010a), como cabría esperar si PAF26 afectara específicamente la glicosilación de proteínas. Asimismo se ha determinado que todos los mutantes $\Delta pmt1-6$ de *S. cerevisiae* fueron más sensibles a un compuesto inhibidor específico de O-glicosilación (OGT2468) (Arroyo *et al.*, 2011), contrariamente a lo que ocurre con PAF26.

1.4. Implicación del gen *ARG1* en la actividad intracelular de PAF26

Se ha determinado que la ausencia de *ARG1*, que codifica una enzima que participa en la biosíntesis de arginina, causa un incremento de resistencia a PAF26 (López-García *et al.*, 2010a), y esto se ha corroborado en esta tesis con una mayor proporción de células con localización vacuolar del péptido y una menor proporción de células completamente teñidas (**Figura 22B** y **Figura 23**). Estos datos indican que el metabolismo de la arginina participa en el transporte intracelular del hexapéptido entre la vacuola y el citoplasma, aunque de una forma que aún no se ha determinado. Como ya hemos comentado, el péptido PAF95, que a diferencia de PAF26 no contiene residuos de arginina ni catiónicos, se localiza restringido en el sistema vacuolar de *N. crassa*, no transportándose desde la vacuola al citoplasma y no siendo activo frente a este hongo. Ya hemos mencionado que el análisis de la localización subcelular de histatina 5 en *C. albicans* también indica que mientras el péptido se encuentra localizado dentro de vacuolas la célula permanece viable (Mochon y Liu, 2008).

Recientemente se comprobó que la acción de PAF26 provoca un aumento de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en levadura (Carmona *et al.*, 2012). El tratamiento de *C. albicans* y *F. oxysporum* con la defensina de planta (PvD1) también resultó en un incremento de la producción de ROS y NO intracelular detectada por microscopía (Mello *et al.*, 2011), aunque la significación de estos incrementos para la actividad antimicrobiana del péptido no fue analizada. El NO es una molécula señalizadora (Kig y Temizkan, 2009; Tillmann *et al.*, 2011) y también de defensa de organismos superiores frente a microorganismos patógenos, debido a su acción antimicrobiana

a altas concentraciones (Fang, 2004). La producción de NO en hongos se asume que está mediada por una enzima del tipo NO sintasa (NOS) dependiente de arginina, de forma análoga a lo que ocurre en plantas y animales superiores, aunque hasta la fecha no ha podido ser identificado el gen correspondiente. En el caso de levadura y PAF26, nuestro grupo ha demostrado que la producción de NO derivado de arginina está relacionada con la muerte celular mediada por el péptido y que el mutante resistente $\Delta arg1$ presenta unos niveles basales de producción de NO muy reducidos y no produce NO como consecuencia del tratamiento con el péptido (Carmona *et al.*, 2012). Estos datos, junto con los aportados en esta tesis, indican que la preservación de PAF26 en las vacuolas de las células fúngicas actúa como un sistema detoxificante/protector, y que su liberación al citosol se relaciona con su contenido en aminoácidos catiónicos, el metabolismo de la arginina y la producción intracelular de NO, lo cual podría estar relacionado con la actividad fungicida por un mecanismo intracelular (Muñoz *et al.*, 2013a).

A modo de resumen, en la **Figura 74** se muestra un esquema de las distintas etapas involucradas durante el mecanismo de acción del péptido PAF26 en *S. cerevisiae* en base a los resultados descritos en este trabajo y en comparación con lo caracterizado en *N. crassa* (Muñoz *et al.*, 2012). Los datos obtenidos indican la existencia de un paralelismo en el mecanismo de acción a bajas concentraciones del péptido sobre ambos organismos, que incluye la interacción con las envueltas celulares, internalización en vacuolas y el transporte desde las vacuolas al citosol causando la muerte celular. Está por confirmar si el péptido tiene o no las mismas dianas moleculares en cada microorganismo. Algunos datos obtenidos en este sentido parecen ser negativos. Por ejemplo, y a diferencia de lo observado en levadura, los mutantes en los genes *PMT1* y *PMT4* de *N. crassa* no mostraron variaciones en su sensibilidad frente al péptido (datos no publicados). Por otro lado, los genes *PMT2* y *EOS1* son supuestamente esenciales en este hongo filamentoso y no pudieron ser evaluados. Tampoco se ha observado un fenotipo diferencial en los análisis del mutante *ARG1* de *N. crassa*. Otra diferencia sustancial encontrada fue la interacción del péptido PAF95, el cual no pudo ser detectado sobre *S. cerevisiae* probablemente porque no es capaz de interactuar con la levadura, mientras que en *N. crassa* se internalizó en vacuolas.

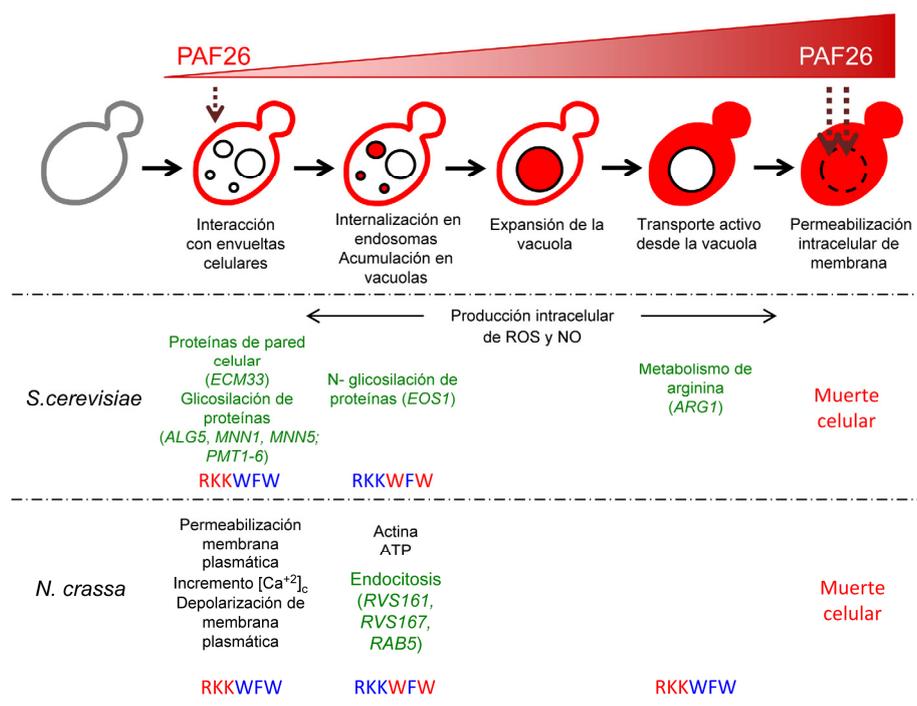


Figura 74. Representación esquemática del mecanismo antifúngico de PAF26 a concentraciones sub-inhedoras en *S. cerevisiae* y *N. crassa*.

La localización del péptido en los distintos pasos se resalta en rojo. Los genes y procesos involucrados en cada paso se indican en verde y los aminoácidos necesarios en rojo.

Esto puede deberse a diferencias en la composición de la pared celular que afectan a la interacción con el péptido. Se prevén futuros estudios para tratar de dilucidar cuales componentes de la pared celular influyen en la interacción y acción antifúngica de PAF26, y también tratar de profundizar en el conocimiento de las interconexiones de los factores moleculares que median la internalización y desencadenan la muerte celular en los hongos.

2. El gen *PdigPmt2* del hongo *P. digitatum* está implicado en la integridad de pared celular, conidiogénesis, virulencia y sensibilidad al péptido antifúngico PAF26

2.1. La familia de genes *PMT* en el hongo *P. digitatum* está compuesta por tres miembros que se expresan en cultivo *in vitro*

La O-glicosilación de proteínas es importante para diversos procesos biológicos de patógenos fúngicos como se ha detallado en la Introducción. Además, y en base a los resultados que acabamos de discutir, se ha demostrado que genes de O-glicosilación de proteínas determinan la sensibilidad de *S. cerevisiae* al hexapéptido PAF26. Por este doble motivo, en la segunda parte de esta tesis se abordó la identificación y caracterización de la familia génica *PMT* en el hongo *P. digitatum*.

Se ha determinado que la familia *PMT* en *P. digitatum* está constituida por tres genes (*PdigPMT1*, *PdigPMT2*, *PdigPMT4*) que son ortólogos a los identificados en *P. chrysogenum* (**Tabla 18**). Se comprobó que existe una elevada sintenia entre ambos genomas en las regiones secuenciadas (**Figura 37**). Esta identidad de secuencia y sintenia son coincidentes con lo descrito previamente en la identificación de genes de biosíntesis de quitina (Gandía *et al.*, 2012). Recientemente, se ha corroborado la similitud entre los genomas de *P. chrysogenum* y *P. digitatum* con la secuenciación del genoma de dos cepas de este último (Marcet-Houben *et al.*, 2012), una de las cuales (PHI26) es la usada en esta tesis. En este estudio se ha constatado el menor tamaño del genoma de *P. digitatum* (26 Mb) comparado con *P. chrysogenum* (32 Mb) (van den Berg *et al.*, 2008). El menor tamaño del genoma de *P. digitatum* se debe a la ausencia de amplias regiones e incluso a la ausencia de algún contig completo de los caracterizados en *P. chrysogenum*.

Las tres proteínas deducidas (*PdigPmt1p*, *PdigPmt2p*, y *PdigPmt4p*) corresponden a un miembro de cada subfamilia *PMT* (**Figura 41**). Durante nuestros análisis no hemos encontrado miembros adicionales. Por una parte, nuestra estrategia de PCR degenerada no identificó clones distintos a los mostrados. Por

otra, las búsquedas sobre el genoma de *P. digitatum* (Marcet-Houben *et al.*, 2012), tampoco revelaron genes adicionales a las tres proteínas descritas. Estos datos nos lleva a sugerir que sólo existen estos tres genes *PMT* en *P. digitatum*. En otros hongos filamentosos como *A. fumigatus*, *A. nidulans* o *U. maydis* también se demostró la presencia de un solo ortólogo para cada subfamilia *PMT* (Zhou *et al.*, 2007; Fernández-Álvarez *et al.*, 2009; Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009). También se ha descrito un solo miembro en *C. neoformans* y *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2007; Willger *et al.*, 2009, Willer, 2005 #4635). En cambio, en *S. cerevisiae* existen más de un miembro en las subfamilias *Pmt1p* y *Pmt2p* debido a una duplicación génica ancestral, mientras que los análisis filogenéticos definen un solo miembro en la subfamilia *Pmt4p* (Lussier *et al.*, 1995; Gentzsch y Tanner, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999) (**Figura 41**). Esto está relacionado con la formación de complejos heterodiméricos entre la subfamilia *Pmt1p* y *Pmt2p*; y de homómeros en la subfamilia *Pmt4p* para el reconocimiento de sustratos específicos y la correcta actividad manosiltransferasa (Gentzsch y Tanner, 1997; Girrbach y Strahl, 2003). En el caso de *C. albicans* existen cinco genes que codifican para manosiltransferasas de proteínas, y cada una de ellas cumplen funciones biológicas específicas (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Las tres secuencias aminoacídicas de *P. digitatum* presentaron los dominios conservados de la superfamilia *PMT* (**Figura 42**) que han sido caracterizados funcionalmente en *S. cerevisiae* (Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach y Strahl, 2003). Esta anotación funcional se ha demostrado en el caso *PdigPMT2* con la complementación funcional de la cepa deletante $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae* (**Figura 44**). Esto permitió confirmar además que el gen *PdigPMT2* participa en el mantenimiento de la integridad de la pared celular y que puede actuar correctamente cuando se expresa de forma heteróloga. Es interesante mencionar que la identidad de secuencia de aminoácidos entre las proteínas *Pmt2* de *P. digitatum* y de *S. cerevisiae* fue de tan sólo el 52 %, siendo el mayor porcentaje de identidad encontrado entre los distintos miembros de ambos hongos (datos no mostrados).

Se han caracterizado los cambios de expresión génica de los tres genes *PMT* de *P. digitatum* comprobándose que se expresan durante el crecimiento

axénico e infección sobre frutos cítricos. Los tres genes contribuyeron al desarrollo del micelio en cultivo sumergido (PDB) en condiciones de no esporulación, registrándose la menor y mayor expresión con *PdigPMT4* y *PdigPMT1*, respectivamente (**Figura 46**). Además, hubo una inducción de los mRNA de *PdigPMT2* y *PdigPMT4* durante el crecimiento en medio PDB (**Figura 47**). Se ha demostrado por análisis Northern que los tres genes *PMT* de *A. nidulans* se expresan durante el desarrollo de micelio en medio líquido con una disminución de los niveles de *PMTB* (*PMT1*) y *PMTC* (*PMT4*) a las 36 h de crecimiento (Oka *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2009). Por otro lado se ha descrito un incremento en los transcritos de *PMT1*, *PMT2* y *PMT4* de *C. albicans* (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005), y *C. neoformans* (Olson *et al.*, 2007) durante el crecimiento en medio líquido. Estos datos confirman que las tres subclases de genes *PMT* participan durante el crecimiento vegetativo de hongos.

2.2. La disrupción del gen *PdigPMT2* de *P. digitatum* tiene un fenotipo viable

En esta tesis se ha obtenido el mutante $\Delta pmt2$ (PDEH515) de *P. digitatum* usando el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* (ATMT) (**Tabla 20** y **Figura 55**). En el momento en el que se inició este trabajo de tesis doctoral no existían ejemplos sobre la aplicación de ATMT para la transformación genética de este hongo postcosecha. El grupo de Wang y colaboradores describieron por primera vez un protocolo de ATMT para la obtención de transformantes en *P. digitatum* (Wang y Li, 2008). Aunque la transformación genética en dicho estudio fue sencilla ya que en ese caso no se necesitó de recombinación homóloga en determinada región genómica, lo cual resulta imprescindible en mutantes de disrupción génica. En estudios posteriores publicados durante el desarrollo de esta tesis también se ha utilizado el sistema ATMT para la disrupción o expresión constitutiva de genes en *P. digitatum*. Entre ellos, se destacan el gen *CYP51B* que codifica para la enzima 14- α -demetilasa involucrada en la biosíntesis de ergosterol y la resistencia a imazalil (Sun *et al.*, 2011b), y el gen *MFS1* perteneciente a la superfamilia de transportadores de membrana MFS (Wang, 2012). La presencia de una inserción de 199 pb en la región promotora *CYP51B* ha sido relacionada con

un incremento de la expresión de dicho gen y el aumento de resistencia a imazalil (Sun *et al.*, 2011b). Se comprobó que la expresión constitutiva de *CYP51B* dio un fenotipo de mayor resistencia. La disrupción de *MFS1* de *P. digitatum* provocó una fuerte disminución en su virulencia sobre frutos cítricos y un aumento de la sensibilidad a imazalil y a otros fungicidas, mientras que la expresión de múltiples copias del mismo gen resultó en mayor resistencia a imazalil (Wang, 2012). Por otro lado, la delección de dos genes en la cepa Pd1 resistente a fungicidas y que no se han encontrado en la cepa PHI26 de *P. digitatum* no disminuyó la resistencia a ninguno de los varios fungicidas ensayados ni tampoco produjo cambios en su virulencia (Marcet-Houben *et al.*, 2012). A pesar de estos trabajos recientes, se puede constatar que hay pocos estudios sobre genes que contribuyan a la morfogénesis y virulencia en *P. digitatum*, lo que denota la importancia de los resultados obtenidos con el mutante PDEH515 en esta tesis.

Es interesante destacar que se ha comprobado que la disrupción del gen *PdigPMT2* en *P. digitatum* es viable, lo que también se ha descrito para el caso del gen homólogo *PMTA* (*PMT2*) de *A. nidulans* y *A. awamori* (Oka *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2005). La delección de este gen fue letal en los patógenos fúngicos *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* y *U. maydis* (Prill *et al.*, 2005; Fernández-Álvarez *et al.*, 2009; Willger *et al.*, 2009; Mouyna *et al.*, 2010). En este sentido, es importante resaltar que fue extremadamente difícil el aislamiento del mutante PDEH515 en *P. digitatum* y que se consiguió realizando la selección en presencia de sorbitol como osmoestabilizante. Asimismo, el disrupto de *PMT1* de *T. reesei* sólo pudo crecer en presencia de sorbitol (Górka-Niec *et al.*, 2008). En esta tesis no se pudo identificar ningún transformante para la disrupción de los genes *PdigPMT1* y *PdigPMT4*, ya que mostraron sólo integraciones ectópicas (**Tabla 20**). Es por ello que no se descarta la posibilidad de que $\Delta pmt1$ y $\Delta pmt4$ en *P. digitatum* sean necesarios para su viabilidad, aunque son necesarios futuros trabajos para mejorar la eficiencia de recombinación homóloga, la cual fue muy baja como se puede constatar en los resultados obtenidos (**Tabla 20**). Hay que tener en cuenta que, por ejemplo, los deletantes en los genes *PMT1* y *PMT4* de *A. nidulans* y *A. fumigatus* han sido obtenidos y caracterizados (Goto *et al.*, 2009; Mouyna *et al.*, 2010). Además, se han caracterizado varios transformantes de expresión

constitutiva de los tres genes *PMT* en *P. digitatum* bajo el promotor *gpdA* (**Tabla 21** y **Figura 56**). Estos datos demuestran la utilidad del sistema ATMT en *P. digitatum* que se constituye en una valiosa herramienta para el estudio funcional de posibles factores de virulencia en este hongo fitopatógeno.

2.3. El gen *PdigPMT2* es necesario para el crecimiento, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la conidiogénesis

En esta tesis, se ha demostrado que la disrupción de *PdigPMT2* provocó efectos negativos sobre el crecimiento y la morfogénesis de *P. digitatum*. El mutante PDEH515 mostró una reducción en su crecimiento radial sobre medio PDA (**Figura 57**) y presentó defectos en la polaridad del micelio con distancias interseptales muy cortas, estructuras globulares y emergencia de ápices dicotómicos (**Figura 61**). Incluso las germínulas tuvieron una polaridad anómala (**Figura 60**). Estos resultados muestran que el gen *PdigPMT2* es necesario para el crecimiento y la polaridad del hongo *P. digitatum*.

En estudios previos también se han descrito defectos fenotípicos similares con mutaciones en genes involucrados en la síntesis de la pared celular de hongos, incluyendo la glicosilación de proteínas. Los mutantes de *PMT4* en *A. fumigatus* y *A. nidulans* presentaron engrosamientos celulares y distancias interseptales muy cortas en sus hifas (Goto *et al.*, 2009; Mouyna *et al.*, 2010). Aunque en *A. fumigatus* se ha demostrado que *PMT2* es un gen esencial (Fang *et al.*, 2010), su expresión reducida también provocó una polaridad defectuosa y la formación de septos anómalos que se atribuyeron a una organización defectuosa del citoesqueleto (Fang *et al.*, 2010). La disrupción del gen *PMTA* (*PMT2*) de *A. nidulans* y *A. awamori* también provocó un crecimiento reducido y defectos en la morfogénesis del micelio con la aparición de estructuras globosas (Shaw y Momany, 2002; Oka *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2005), similar a nuestras observaciones con el mutante PDEH515. Estas estructuras globosas también se han encontrado en mutantes de genes que participan en la síntesis de quitina de la pared celular en varios hongos (Martín-Urdíroz *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2009). En nuestro grupo, también se han observado con el mutante del gen quitin-sintasa de la clase VII de *P. digitatum* (datos aun no publicados). Estas alteraciones

morfológicas reflejan que estos mutantes tienen una pared celular alterada, generándose estos engrosamientos celulares con mayor contenido de quitina para aumentar la rigidez de su micelio.

La mayor sensibilidad del mutante PDEH515 a compuestos antifúngicos como CFW y CR, y al detergente SDS (**Figura 63**), de igual manera a lo caracterizado con *S. cerevisiae* ($\Delta pmt2$) y la recuperación del defecto de crecimiento en presencia de sorbitol (**Figura 58**) confirman que parte de los fenotipos descritos se relacionan con defectos en la estructura y composición de la pared celular. En esta tesis también se ha comprobado que los genes *PdigPMT2* y *PdigPMT4* se inducen en el hongo crecido en medio PDA con sorbitol (**Figura 49**). Por el contrario, en estudios previos se había demostrado una represión de la mayoría de los genes *CHS* durante el crecimiento con sorbitol de *P. digitatum* (Gandía *et al.*, 2012). Estos resultados apoyan la remodelación de la pared celular en presencia de un osmoestabilizador para permitir el desarrollo fúngico. Además, se correlaciona con nuestros datos obtenidos con que el defecto de crecimiento del mutante PDEH515 es aliviado por algún mecanismo de adaptación osmótica.

Se sabe que una deficiente glicosilación de proteínas influye negativamente sobre la integridad de la pared celular. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que las cepas deletantes ($\Delta pmt2pmt3$, $\Delta pmt2pmt4$; $\Delta pmt1pmt2pmt3$) fueron osmolábiles (Gentsch y Tanner, 1996). Los mutantes *PMT* en *A. nidulans* (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009), *A. awamori* (Oka *et al.*, 2005) y *A. fumigatus* (Zhou *et al.*, 2007; Mouyna *et al.*, 2010) mostraron fenotipos de reducido crecimiento y fueron osmoremediables. Además, en varios de esos mutantes se ha comprobado que varió la composición de los polisacáridos de su pared celular e incluso presentaron un incremento de sensibilidad a CFW, CR y SDS. Esto demuestra que ante una incorrecta glicosilación de proteínas se producen ciertos mecanismos compensatorios para refortalecer y estabilizar a las células. Por ejemplo, los mutantes de *PMTA* (*PMT2*) en *A. nidulans* mostraron un mayor contenido de quitina y una disminución de los glucanos de la pared celular, y una mayor sensibilidad a CFW y CR (Shaw y Momany, 2002; Oka *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2005). En base a nuestros resultados con el mutante PDEH515 se

podría inferir un mismo comportamiento, aunque sería necesario realizar un análisis cuantitativo de los componentes de su pared celular para confirmar esta hipótesis.

Una de las características fenotípicas más relevantes del mutante PDEH515 fue la drástica disminución en esporulación (**Figura 57**), que no se pudo recuperar con sorbitol (**Figura 59**). El fenotipo de baja esporulación se corroboró por microscopía con el desarrollo y formación anómala de conidióforos que conlleva una muy reducida formación de conidios (**Figura 62**). También se ha comprobado que los transcritos de *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* se incrementaron con el tiempo durante su crecimiento en medio PDA y que coincidieron con la mayor esporulación del hongo, presentando la máxima inducción con el gen *PMT2* (**Figura 48**), lo que es consistente con los defectos observados en la esporulación del mutante PDEH515. Estos datos sugieren que el gen *PdigPMT2* participa en el proceso de conidiogénesis y que este defecto en esporulación no se revierte bajo condiciones osmoestabilizadoras. Aunque nuestros resultados con el mutante PDEH515 no pueden desvelar cuál es el mecanismo por el que *PMT2* afecta la esporulación de *P. digitatum*, existen distintas alternativas. La más obvia y directa es de tipo estructural, e implica que la no glicosilación de proteínas específicas de pared afecta negativamente al desarrollo de conidióforos, de forma análoga a cómo afecta a la integridad de la pared celular. El fuerte incremento de expresión que hemos observado para *PdigPMT2* en cultivo y durante la infección apoyaría esta alternativa estructural.

Pero varios estudios sugieren una implicación más sutil de los genes *PMT* en la conidiogénesis de hongos filamentosos, y relacionada con la señalización. La disrupción de los genes *PMT* en el hongo *A. nidulans* también provocaron una severa reducción en la conidiogénesis que tampoco fue osmoremediable y que estuvo asociada con una formación anormal de conidióforos (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat y Momany, 2009). En *A. fumigatus*, el mutante de $\Delta pmt4$ y la expresión reducida de *PMT2* también presentaron fenotipos de baja esporulación (Fang *et al.*, 2010; Mouyna *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descrito que la disrupción de las proteínas WscAp y WscBp en *A. nidulans* afectó negativamente el

crecimiento y la esporulación del hongo, presentando defectos fenotípicos similares a los encontrados con los mutantes en sus genes *PMT* (Futagami *et al.*, 2011). Estas proteínas son homólogas a Wsc1p y Wsc4p de la familia de proteínas WSC de *S. cerevisiae*, y son fuertemente glicosiladas por *PMTA* (*PMT2*) y *PMTC* (*PMT4*) de *A. nidulans* (Goto *et al.*, 2009; Futagami *et al.*, 2011), similar a lo descrito en levadura (Philip y Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004). La familia de proteínas WSC (Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p y Wsc4p) y Mid2p están localizadas en la membrana plasmática y actúan como moléculas mecanosensoras de la cascada de señalización de integridad de pared celular (CWI) (Philip y Levin, 2001; Levin, 2005). De acuerdo con ello, el mutante $\Delta pmt2pmt4$ de levadura provocó una glicosilación defectuosa de esas proteínas afectando la activación de la ruta CWI (Lommel *et al.*, 2004). Se ha demostrado recientemente que los hongos filamentosos conservan la familia WSC, mientras que no existen homólogos a Mid2p (Rispaill *et al.*, 2009). Además, estas proteínas son responsables de la señalización a los eslabones inferiores de las cascadas MAP quinasas que se han relacionado con conidiogénesis, morfogénesis y virulencia (Rispaill *et al.*, 2009). Se podría proponer un mecanismo similar para *P. digitatum*, donde el gen *PdigPMT2* estaría glicosilando alguna de estas proteínas sensoras que activen las rutas implicadas en conidiogénesis. La alteración del desarrollo de conidióforos desde sus fases iniciales (**Figura 62**) apoyaría esta alternativa de señalización.

2.4. Implicación del gen *PdigPMT2* en la actividad de PAF26 sobre *P. digitatum*

Nuestros resultados previos indican que la expresión de los genes *PMT* de *S. cerevisiae* no cambia por exposición al péptido PAF26, a pesar de la marcada resistencia de sus deletantes, y en concreto de $\Delta pmt2$ (Carmona y Marcos, datos no publicados). Curiosamente, y por el contrario, se ha demostrado una considerable represión de la expresión de los genes *PdigPMT1*, *PdigPMT2* y *PdigPMT4* en el hongo *P. digitatum* expuesto a concentraciones crecientes de PAF26 (**Figura 50**). Es muy relevante mencionar que hemos detectado una inducción de genes de biosíntesis de quitina (*CHS*) en las mismas condiciones experimentales (Gandía y Marcos, datos no publicados). Previamente se había

demostrado que en el micelio del hongo tratado con PAF26 se producían alteraciones morfológicas y un incremento en la tinción con CFW, relacionadas a una mayor deposición de quitina en las células expuestas al péptido (Muñoz *et al.*, 2006) que serían consistentes con el mencionado aumento de genes *CHS*. Estos resultados indican que se produce una remodelación de la estructura de la pared celular del hongo como consecuencia de la interacción con el péptido.

Existen investigaciones que demuestran cambios en la composición de la pared celular de otros hongos expuestos a proteínas antifúngicas. Por ejemplo se ha comprobado un aumento de quitina en los mutantes del gen quitin-sintasa clase 1 ($\Delta chs1$) de levadura y clase 5 de $\Delta chsV$ de *A. oryzae* y *F. oxysporum* tratados con la proteína AFP de *A. giganteus* y para la cual habían presentado fenotipos de menor sensibilidad (Ouedraogo *et al.*, 2011). Esto sugiere que el refortalecimiento de la pared celular de los hongos con quitina es un mecanismo general protector a la toxicidad antifúngica de péptidos o proteínas antifúngicas (Ouedraogo *et al.*, 2011). Previamente se había demostrado la inhibición en la síntesis de quitina en los hongos de fenotipos sensibles (*A. oryzae* y *F. oxysporum*) tratados con la misma proteína antifúngica (Hagen *et al.*, 2007). Mediante tinción con CFW, se constató que las hifas de *A. nidulans* tratadas con la proteína antifúngica PAF de *P. chrysogenum* fueron menos fluorescentes, lo que indicaría una reducción en quitina, aunque esto no se pudo corroborar con cambios en la expresión génica de genes de biosíntesis de quitina (Binder *et al.*, 2010b). Esto es opuesto a lo caracterizado en *P. digitatum* expuesto a PAF26 (ver más arriba).

Se sabe que la pared celular de los hongos es una excelente diana para el desarrollo de nuevos antifúngicos. En este sentido, las proteínas PMT que actúan como factores de virulencia en hongos patógenos como *C. albicans* (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000; Ernst y Prill, 2001), y *U. maydis* (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009) se convierten en prometedoras dianas moleculares para el diseño de nuevos compuestos antifúngicos para su control. Como ya hemos discutido, la glicosilación de proteínas en levadura es uno de los procesos celulares que intervienen en su sensibilidad frente a PAF26 y otros péptidos antifúngicos. De acuerdo con ello, se ha comprobado que los conidios del mutante PDEH515

también fueron resistentes a la actividad fungicida del péptido (**Figura 67**) de forma similar a como se había mostrado con $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*. Sin embargo, esta mayor resistencia del mutante PDEH515 no se pudo confirmar en los ensayos de inhibición del crecimiento, obteniéndose valores MIC del péptido similares que con la cepa PHI26 (**Figura 66**). Aunque hay que tener en cuenta que el reducido crecimiento de PDEH515 podría estar afectando estos experimentos. La resistencia caracterizada en los mutantes de *PMT2* en levadura y *P. digitatum* indican que la glicosilación de proteínas influye sobre la actividad antifúngica de PAF26 en ambos organismos. Por ello, se tiene previsto evaluar en el futuro si mutaciones al azar que aumenten la resistencia al péptido conllevan la generación de mutaciones en los genes *PMT*.

En relación a la sensibilidad de mutantes en genes *PMT* de otros hongos filamentosos frente a péptidos antimicrobianos, existe muy poca información disponible. Se ha comprobado que la disrupción de *PMT4* en *A. fumigatus* (Mouyna *et al.*, 2010) y de *PMT1* y *PMT4* en *A. nidulans* (Goto *et al.*, 2009) provocaron una mayor sensibilidad frente al lipopéptido equinocandina y otros compuestos relacionados. En varios estudios se ha determinado que las equinocandinas activan las cascadas relacionadas con CWI y ruta HOG en *S. cerevisiae* (Reinoso-Martin *et al.*, 2003) y *C. albicans* (Liu *et al.*, 2005) lo que sugiere un efecto sobre la pared celular tal y como ocurre con PAF26. En *A. fumigatus* se ha demostrado que la mayor sensibilidad a caspofungina del mutante $\Delta pmt4$ estuvo asociada con la inducción de los genes *CWH43*, *PKC1*, y *SAKA* que participan en dichas rutas de señalización y no necesariamente al contenido de β -1,3-glucanos, que es la diana de las equinocandinas (Mouyna *et al.*, 2010). Las proteínas sensoras Wsc1p y Mid2p de levaduras que transmiten las señales de estrés al CWI también median la tolerancia a equinocandinas y como se ha descrito previamente son glicosiladas por *PMT2* y *PMT4*. El mutante $\Delta mid2$ mostro una mayor sensibilidad a caspofungina, mientras que existen ciertas controversias con el fenotipo del mutante $\Delta wsc1$ ya que en algunos estudios fue hiperresistente (Lesage *et al.*, 2004; Markovich *et al.*, 2004) y en otro estudio independiente fue sensible a este compuesto antifúngico (Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Nuestro grupo ha encontrado que el mutante $\Delta mid2$ de *S. cerevisiae* tuvo un fenotipo levemente resistente a

PAF26 (López-García *et al.*, 2010a) y se prevé analizar en el futuro el impacto de WSC sobre la sensibilidad al péptido. Estos resultados indican que estas proteínas sensoras y muy glicosiladas están involucradas en la respuesta de la célula a varios compuestos antifúngicos, incluidos péptidos, de forma análoga a como hemos discutido anteriormente en conidiogénesis.

En esta tesis se ha determinado que la toxicidad de PAF26 sobre los conidios del hongo disminuye al utilizar un estabilizador osmótico (sorbitol), ya que el porcentaje de viabilidad obtenido de la cepa silvestre (PHI26) aumenta y se iguala con el del fenotipo resistente de PDEH515 (**Figura 67**). Esto se relaciona con nuestros datos de expresión génica de la cepa PHI26 crecida en PDA con sorbitol con la inducción de genes *PMT* (**Figura 48**) y represión de *CHS* (Gandía *et al.*, 2012), y que fueron opuestos durante la exposición con el péptido (**Figura 49** y datos no publicados), lo que podría explicarse en cierta manera como que el osmoestabilizador influye en la composición de la pared celular de forma opuesta a como lo hace el péptido, contrarrestando su acción. Además, se ha demostrado que los fenotipos resistentes de *CHS* de *A. oryzae* (clase III $\Delta chsB$ y clase V $\Delta chsV$) y *F. oxysporum* ($\Delta chsV$) frente a la proteína AFP de *A. giganteus* no cambiaron en presencia de sorbitol (Hagen *et al.*, 2007), igual que ocurre con la resistencia del mutante PDEH515 y PAF26. Por el contrario, el sorbitol favoreció la penetración y actividad antifúngica de histatina 5 sobre *C. albicans*, mientras que el NaCl tuvo un efecto opuesto (Jang *et al.*, 2010). La adición de sorbitol también redujo la actividad antifúngica de la proteína AFP_{NN5353} de *A. giganteus* sobre el hongo *A. nidulans* (Binder *et al.*, 2011) y de la defensina Pn-AMP1 sobre levaduras (Koo *et al.*, 2004). Estos datos en su conjunto demuestran la participación de la integridad de la pared celular en el mecanismo de acción de péptidos o proteínas antifúngicas, incluyendo a PAF26.

2.5. Participación de los genes *PMT* en la infección de *P. digitatum* sobre frutos cítricos

La O-glicosilación de proteínas se ha relacionado con la virulencia de patógenos fúngicos, tanto en hongos que afectan a humanos (Goto, 2007; Lengeler *et al.*, 2008) como a plantas (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009). En esta

tesis se ha demostrado que los genes *PMT* participan durante el progreso de la infección de *P. digitatum* sobre naranjas. Los transcritos de los tres genes *PMT* se detectaron a 48 hpi sobre naranjas (**Figura 51**). Fundamentalmente *PdigPMT2* pero también *PdigPMT4* tuvieron la mayor inducción durante la infección, coincidiendo con una mayor esporulación del hongo sobre los frutos infectados. La disrupción del gen *PdigPMT2* disminuyó la virulencia de *P. digitatum* y además no hubo esporulación del hongo sobre los tejidos infectados (**Figura 68**). Estos datos resaltan la importancia del gen *PdigPMT2* para la virulencia de este hongo fitopatógeno y además, estarían de acuerdo con su papel en conidiogénesis tal y como se lo ha discutido previamente. La reducción en virulencia del mutante PDEH515 podría deberse a su lento crecimiento vegetativo que limitaría la extensión de sus hifas y la colonización de los tejidos del huésped. Hasta la fecha no existen ejemplos que vinculen la disrupción del gen *PMT2* con la virulencia de patógenos fúngicos, puesto que como ya hemos mencionado su disrupción causa un fenotipo letal en muchos casos. En distintos estudios previos con *C. albicans* se ha comprobado que los genes *PMT1*, *PMT4* y *PMT6* se requieren también para su completa virulencia (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Este fenotipo de reducida virulencia se ha relacionado con una menor adherencia sobre el tejido del huésped debido a defectos en la glicosilación de proteínas como Als1p, Kre9p y Pir2p para $\Delta pmt1$ o Sec20p y Axl2p para $\Delta pmt4$ (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2004; Prill *et al.*, 2005). La disrupción de los genes *PMT1* y *PMT4* en *C. neoformans* también provocó una reducción en la virulencia que fue asociada con una menor diseminación por el huésped debido a una separación celular defectuosa (Olson *et al.*, 2007). En cambio, la disrupción de los genes *PMT1* y *PMT4* en *A. fumigatus* no afectó su virulencia (Zhou *et al.*, 2007; Mouyna *et al.*, 2010). Los datos sobre implicación en virulencia en el ámbito de la fitopatología son todavía más escasos. En este sentido, la disrupción del gen *PMT4* de *U. maydis* afectó negativamente en la patogénesis de este hongo biótrofo sobre maíz ocasionando que sea incapaz de producir tumores (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009). Se ha comprobado que el mutante $\Delta pmt4$ en *U. maydis* tuvo afectada la formación de apresorios y la penetración en los tejidos vegetales. Recientemente se ha demostrado que $\Delta pmt4$ en *U. maydis* tiene defectos en la adhesión celular

(Fernández-Álvarez *et al.*, 2012). El gen *ALG2*, involucrado en las etapas iniciales de N-glicosilación también fue necesario para la patogenicidad de *Mycosphaerella graminicola* ya que el mutante $\Delta alg2$ fue menos infectivo sobre hojas de trigo y estuvo asociado al defecto de transición del crecimiento levaduriforme a hifal que se constituye en uno de los factores claves para la infección de este fitopatógeno (Motteram *et al.*, 2011).

Se sabe que los tejidos de los frutos infectados producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como una respuesta de defensa contra el ataque de *P. digitatum* (Macarisin *et al.*, 2007). El hongo suprime la producción de ROS por parte del fruto. En esta tesis se ha demostrado que los genes *PdigPMT2* y *PdigPMT4* se inducen durante el crecimiento en medio PDA con H_2O_2 , mientras que *PdigPMT1* se reprime (**Figura 49**). Además se ha identificado que las regiones promotoras de *PdigPMT1* y *PdigPMT2* presentan posibles sitios de unión al factor de transcripción Yap1p involucrado en la respuesta a estrés oxidativo (**Figura 38**). Sin embargo, y en ausencia de datos funcionales de los promotores, no está clara la implicación de estos sitios de unión en esta respuesta, ya que *PdigPMT1* se reprime y *PdigPMT2* se induce en estrés oxidativo, mientras que *PdigPMT4* no parece tener sitios de unión a Yap1p. En base a nuestros datos, si se podría establecer que los genes *PMT* participan de alguna manera en la respuesta frente al estrés oxidativo. Esto se ha corroborado con la disrupción del gen *PdigPMT2*, ya que el mutante PDEH515 fue levemente resistente frente a H_2O_2 (**Figura 65**). Por otra parte, y teniendo en cuenta estos resultados, se puede afirmar que la reducida virulencia del mutante PDEH515 no se debe a una mayor sensibilidad a las ROS producidas por los frutos cítricos infectados. Esto es similar a lo encontrado con el mutante $\Delta pmt4$ en *U. maydis* cuyo fenotipo de reducida patogenicidad tampoco es debido a la producción de ROS por parte del huésped (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009); el uso de un inhibidor de la NADPoxidasa de planta implicada en la formación de ROS no contrarrestó la menor virulencia del mutante mientras que si lo hizo con el mutante $\Delta yap1$.

Existen evidencias que demuestran que parte de los fenotipos de virulencia reducida caracterizados en los mutantes *PMT* se deben a defectos en la

glicosilación de ciertas proteínas que activan las cascadas de señalización celular implicadas en patogenicidad. Por ejemplo, el mutante $\Delta pmt4$ de *U. maydis* provoca una glicosilación defectuosa de la mucina de membrana Msb2p, que participa en la activación de la cascada MAP quinasa involucrada en la formación de apresorios (Fernández-Álvarez *et al.*, 2012). La delección del gen *MSB2* en *F. oxysporum* resultó en un fenotipo de menor virulencia sobre plantas de tomate (Pérez-Nadales y Di Pietro, 2011). Este estudio demostró que el mutante $\Delta msb2$ tuvo defectos en la penetración y colonización de los tejidos del huésped y reveló que esta mucina hiperglicosilada también activa la cascada MAP quinasa a través de la fosforilación de Fmk1p, siendo este último necesario para el crecimiento invasivo y patogénesis de este hongo fitopatógeno. En *C. albicans* se ha demostrado una interconexión entre componentes de las cascadas MAP quinasa y los defectos de glicosilación, ya que la sobreexpresión de Cek1p y Tpk2 en los mutantes *PMT* restauró la formación de sus hifas, uno de los factores de virulencia clave de este patógeno en humanos (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000; Ernst y Prill, 2001). Se prevén futuros estudios para identificar las posibles proteínas O-glicosiladas por PdigPmt2p con el objeto de conocer cómo intervienen en la interacción de patosistema *P. digitatum*-*Citrus* sp, en la morfogénesis y virulencia del hongo y en su sensibilidad a péptidos antifúngicos, poniendo énfasis en proteínas tanto de pared celular como de señalización.

A modo de resumen, en la **Figura 75** se muestran las funciones inherentes al gen *PdigPMT2* en *P. digitatum* en base a los resultados descritos en esta tesis con el mutante PDEH515 y en comparación al fenotipo de la cepa silvestre PHI26. Se ha comprobado que *PdigPMT2* es necesario para el crecimiento normal y determina la sensibilidad del hongo frente compuestos antimicrobianos como blanco de calcofluor, rojo Congo, y el péptido antifúngico PAF26. Se han observado varios defectos morfológicos en el micelio del mutante PDEH515 relacionados con una polaridad defectuosa y un desarrollo anómalo de conidióforos que fue claramente correlacionado con su baja tasa de esporulación. Finalmente, se ha demostrado que el mutante PDEH515 tuvo una fuerte reducción en la virulencia sobre frutos cítricos.

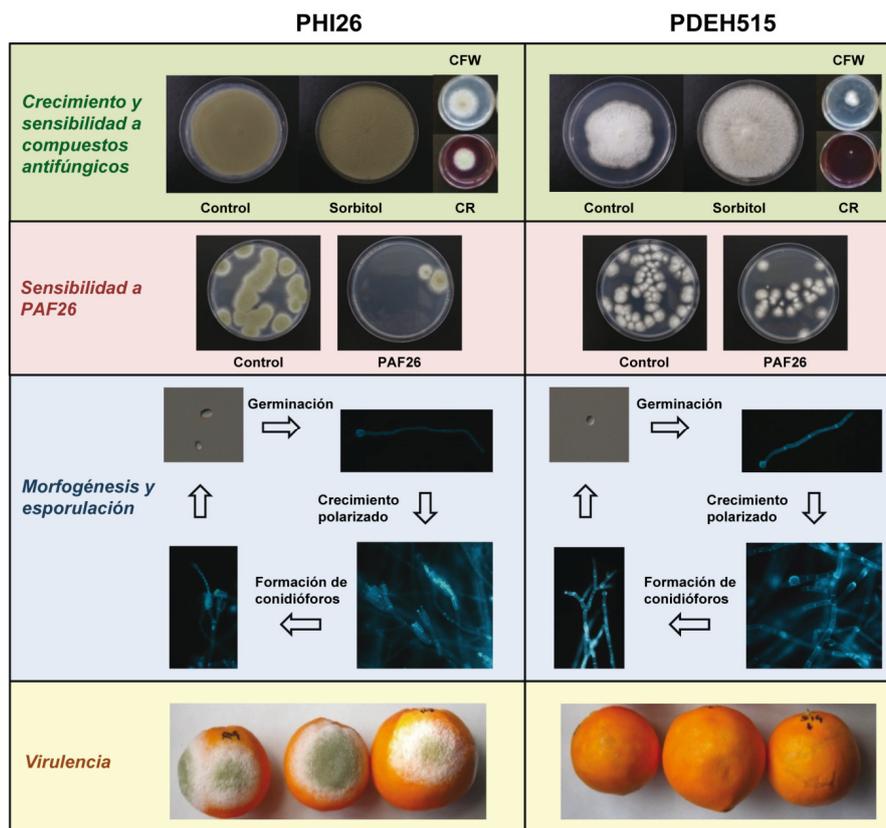
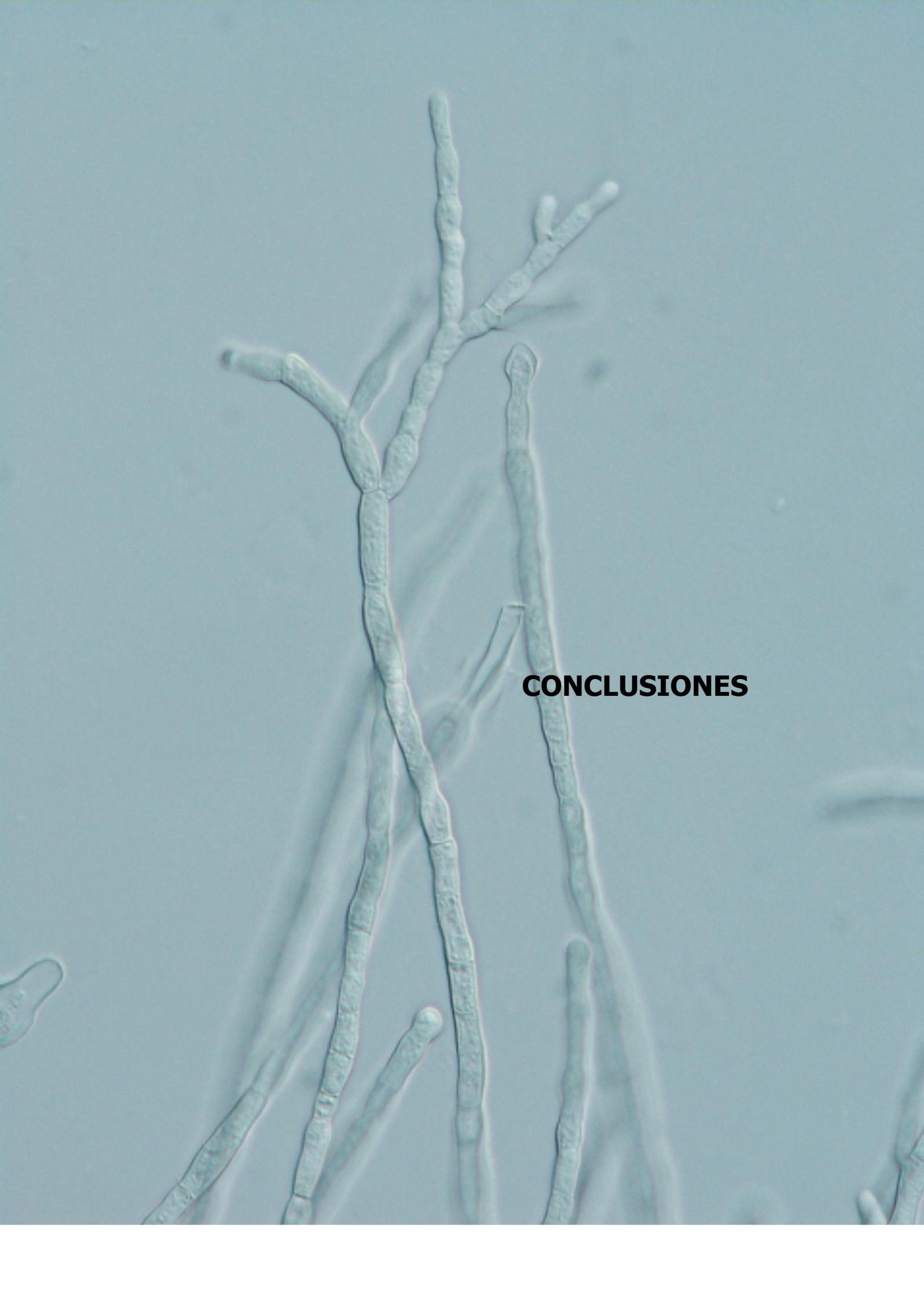


Figura 75. Efecto de la disrupción de *PdigPMT2* sobre distintos procesos biológicos de *P. digitatum*.

Se muestran fotografías representativas del disrupto PDEH515 (panel derecho) y comparado con PHI26 (panel izquierdo). Nótese los defectos de crecimiento y esporulación del mutante PDEH515, su mayor sensibilidad a compuestos antifúngicos y su resistencia a PAF26, como también sus alteraciones morfológicas y su menor virulencia sobre naranjas.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La interacción de PAF26 con *S. cerevisiae* es consistente con los resultados previos de *N. crassa* y define al menos tres etapas en el mecanismo antifúngico del péptido: interacción con las envueltas celulares, internalización y localización en vacuolas, y muerte celular.
2. La existencia de una pared celular funcional en *S. cerevisiae* es necesaria para la interacción e internalización, y por tanto toxicidad de PAF26.
3. El motivo catiónico de PAF26 es necesario para la interacción con *S. cerevisiae*, mientras que los residuos de triptófano son necesarios para la internalización celular.
4. El gen de N-glicosilación de proteínas *EOS1* está implicado en la internalización de PAF26 en *S. cerevisiae*, mientras que el gen de la biosíntesis de arginina *ARG1* está implicado en la toxicidad intracelular y la localización en vacuolas.
5. La familia PMT en el hongo fitopatógeno *P. digitatum* está constituida por tres proteínas PdigPmt1p, PdigPmt2p y PdigPmt4p que representan un miembro para cada subfamilia, de forma similar a lo que ocurre con otros hongos filamentosos.
6. El gen *PMT2* de *P. digitatum* complementa funcionalmente el fenotipo de sensibilidad a blanco de calcoflúor de la cepa deletante $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*.
7. Los tres genes *PdigPMT* se expresan durante el crecimiento vegetativo, la esporulación y la infección sobre frutos de naranjas.
8. La expresión de los genes *PdigPMT* se reprime en cultivos del hongo expuesto al péptido PAF26, mientras que en general se induce bajo condiciones de estrés osmótico y oxidativo.
9. El gen *PdigPMT2* es necesario para la correcta estructura de la pared celular, el crecimiento vegetativo, la polaridad y la conidiogénesis de

P. digitatum. Probablemente como consecuencia de todo ello, este mutante se caracteriza por una virulencia reducida sobre frutos cítricos.

- 10.** Los conidios del mutante PDEH515 fueron más resistentes a la actividad fungicida de PAF26, de forma análoga a lo que ocurre con la cepa deletante $\Delta pmt2$ de *S. cerevisiae*.

A microscopic image showing several long, thin, filamentous structures, likely algae, against a light blue background. The filaments are composed of individual cells, some of which are slightly thicker or more rounded than others. The text "DIFUSIÓN DE RESULTADOS" is overlaid in the center of the image.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Publicaciones referidas en el Science Citation Index (SCI)

Muñoz, A., Harries, E., Contreras-Valenzuela, A., Carmona, L., Read, N.D. & Marcos, J.F., 2013. Two functional motifs define the interaction, internalization and toxicity of a small cell penetrating antifungal peptide. *PLoS ONE* **8** (1): e54813.

Muñoz, A., Gandía, M., Harries, E., Carmona, L., Read, N.D. & Marcos, J.F., 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.

Harries, E., Carmona, L., Muñoz, A., Ibeas, J.I., Read, N. D., Gandía, M., & Marcos, J.F. Genes of *Saccharomyces cerevisiae* involved in protein glycosylation determine the activity and cell internalization of the antifungal peptide PAF26. (En preparación).

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L. & Marcos, J.F. The Protein O-Mannosyltransferase *PMT2* of the citrus-specific postharvest pathogen *Penicillium digitatum* is involved in conidiogenesis, virulence and sensitivity to the antifungal peptide PAF26. (En preparación).

Otras publicaciones relacionadas

Gandía, M., Harries, E. & Marcos, J.F., 2012. Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Biology* **116**, 654-664.

Marcet Houben, M., Ballester, A. R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J.F., González-Candelas, L., & Gabaldón, T., 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* **13**, 646.

Gandía, M., Harries, E. & Marcos, J.F., 2013. Disruption of the chitin synthase gene *PdigChsVII* causes reduced growth and altered morphology in the postharvest citrus fruit pathogen *Penicillium digitatum*. (En preparación).

Publicaciones No SCI

Marcos, J.F., Gandía, M., Harries, E., Carmona, L., Muñoz, A., 2012. Antifungal peptides: Exploiting non-lytic mechanism and cell penetration properties. *Small Wonders: Peptides for disease control*. ACS Symposium Series **1095**, 337-357. ACS Press. Editors: Rajasekaran, K., Cary, J. W., Jaynes, J. y Montesinos, E.

Presentaciones a congresos internacionales

Harries, E., Gandía, M., Marcos, J.F., 2011. Characterization of Protein Mannosyltransferase (*PMT*) in the postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. Póster. Fungal Development and Pathogenesis (BMS). Exeter (Reino Unido).

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L., Read, N., Muñoz, A., Marcos, J.F. 2012. Genes involved in Protein Glycosylation determine the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26. Póster. 11 th European Conference on Fungal Genetics. Marburg (Alemania).

Gandía, M., Harries, E., Marcos, J.F., 2012. Identification of chitin synthase genes (*CHS*) in the postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. Changes of expression during growth and citrus fruit infection. Póster. 11 th European Conference on Fungal Genetics. Marburg (Alemania).

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L. and Marcos, J. F. The Protein O-Mannosyltransferase *PMT2* is involved in conidiogenesis, virulence and sensitivity to antifungal peptides in the citrus-specific postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. Oral. Fungal Interactions (BMS). Alicante (España) 2012.

Marcet-Houben, M., Ballester, A. R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J. F., Gabaldón, T. & González-Candelas, L., 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. Póster. GDRE European Research Network. Francia.

Ballester, A. R., Marcet-Houben, M., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J. F., Gabaldón, T. & González-Candelas, L., 2012. Genome sequence of the

necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. Póster. International Citrus Congress. Valencia (España).

Gandía, M., Harries, E. & Marcos, J.F., 2012. Disruption of the Chitin Synthase gene *PdigChsVII* in the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. Póster. International Citrus Congress. Valencia (España).

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L. & Marcos, J.F., 2012. The Protein O-Mannosyltransferase *PMT2* of the citrus-specific postharvest pathogen *Penicillium digitatum* is involved in conidiogenesis, virulence and sensitivity to the antifungal peptide PAF26. Oral. International Citrus Congress. Valencia (España).

Presentaciones a congresos nacionales

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L., Marcos, J.F., 2010. La familia de Proteínas manosiltransferasas (*PMT*) en el hongo *Penicillium digitatum*, agente causal de la podredumbre verde en frutos cítricos. Póster. X Congreso Nacional de Micología. Sevilla (España).

Gandía, M., Harries, E., Marcos, J.F., 2010. Caracterización de genes implicados en la biosíntesis de quitina en el hongo patógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*. Póster. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria- Gasteiz (España).

Harries, E., Gandía, M., Marcos, J.F., 2010. Identificación y caracterización de genes *PMT* (Protein-O-mannosyltransferase) en el hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum*. Oral y Póster. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria- Gasteiz (España).

Harries, E., Gandía, M., Carmona, L. & Marcos, J.F., 2012. El gen de glicosilación de proteínas *PMT2* del patógeno postcosecha de frutos cítricos *Penicillium digitatum* participa en la conidiogénesis, virulencia y sensibilidad al péptido antimicrobiano PAF26. Póster. XI Congreso Nacional de Micología. Cádiz (España).

Gandía, M., Harries, E. & Marcos, J.F., 2012. Disrupción del gen de biosíntesis de quitina *PdigChsVII* en el hongo patógeno postcosecha de frutos

cítricos *Penicillium digitatum*. Póster. XI Congreso Nacional de Micología. Cádiz (España).

A microscopic image of filamentous cyanobacteria, showing several long, thin, branching structures. The filaments are composed of individual cells, some of which are slightly larger and more rounded than others, possibly representing heterocysts. The background is a light, uniform color. The word "BIBLIOGRAFÍA" is overlaid in bold black text on the right side of the image.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abad LR, *et al.*, 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* **118**, 11-23.
- Aerts AM, Francois IEJA, Bammens L, Cammue BPA, Smets B, Winderickx J, Accardo S, De Vos DE, Thevissen K, 2006. Level of M(IP)(2)C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Letters* **580**, 1903-1907.
- Aerts AM, Francois IEJA, Cammue BPA, Thevissen K, 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2069-2079.
- Aerts AM, Francois IEJA, Meert EMK, Li QT, Cammue BPA, Thevissen K, 2007. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**, 243-247.
- Agrios GN, 2004. *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Aimanianda V, Latgé JP, 2010. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. *Expert Review Anti Infective Therapy* **8**, 359-364.
- Ali GS, Reddy AS, 2000. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: *in vitro* growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 847-859.
- Andrés MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF, 2008. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*. Critical role of K⁺ channel-mediated K⁺ efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 4081-4088.
- Arras G, 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology* **8**, 191-198.
- Arroyo J, *et al.*, 2011. Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Molecular Microbiology* **79**, 1529-1546.
- Bai C, Xu XL, Chan FY, Lee RTH, Wang Y, 2006. *MNN5* encodes an iron-regulated alpha-1,2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **5**, 238-247.
- Ballester AR, 2007. Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. Universidad de Valencia.
- Ballester AR, Izquierdo A, Lafuente MT, González-Candelas L, 2010. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* **56**, 31-38.

- Ballester AR, Lafuente MT, Forment J, Gadea J, De Vos RC, Bovy AG, González-Candelas L, 2011. Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance. *Molecular Plant Pathology* **12**, 879-897.
- Barkai-Golan R, 2001. *Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control*. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Batta G, *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**, 2875-2890.
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Barka EA, Bosquez-Molina E, Wilson CL, 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* **25**, 108-118.
- Ben-Yehoshua S, Rodov V, Fang DQ, Kim JJ, 1995. Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1062-1066.
- Binder U, Bencina M, Eigentler A, Meyer V, Marx F, 2011. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFPNN5353 activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiology* **11**.
- Binder U, Chu M, Read ND, Marx F, 2010a. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **9**, 1374-1382.
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F, 2010b. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **75**, 294-307.
- Bowman SM, Free SJ, 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**, 799-808.
- Breukink E, van Heusden HE, Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S, Heck AJR, de Kruijff B, 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 19898-19903.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW, 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* **108**, 1353-1358.
- Brogden KA, 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M, 2005. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nature Immunology* **6**, 558-564.
- Brown DW, *et al.*, 2005. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 848-861.

- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White T, 2012. Human fungal infections: the hidden killers. *Science Translational Medicine* **4**, 165rv113.
- Brown KL, Hancock REW, 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* **18**, 24-30.
- Buron-Moles G, López-Pérez M, González-Candelas L, Viñas I, Teixidó N, Usall J, Torres R, 2012. Use of GFP-tagged strains of *Penicillium digitatum* and *P. expansum* to study host-pathogen interactions in oranges and apples. *International Journal of Food Microbiology* **160**, 162-170.
- Cantero PD, Ernst JF, 2011. Damage to the glycoshield activates PMT-directed O-mannosylation via the Msb2-Cek1 pathway in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **80**, 715-725.
- Cantero PD, Lengsfeld C, Prill SKH, Subanovic M, Roman E, Pla J, Ernst JF, 2007. Transcriptional and physiological adaptation to defective protein O-mannosylation in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **64**, 1115-1128.
- Carmona L, Gandía M, López-García B, Marcos JF, 2012. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**, 56-61.
- Carvalho A, Gomes VM, 2009. Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* **30**, 1007-1020.
- Castle M, Nazarian A, Yi SS, Tempst P, 1999. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 32555-32564.
- Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B, 1998. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 218-227.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP, 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 777-788.
- Cowen LE, Steinbach WJ, 2008. Stress, Drugs, and Evolution: the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryotic Cell* **7**, 747-764.
- Cummings RD, Doering TL, 2009. Fungi. *Essentials of Glycobiology*. **21**.
- Davidse LC, 1988. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and resistance, in: Delp CJ (Ed), *Fungicide Resistance in North America*, pp. 25-27.
- De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM, 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **16**, 839-842.
- De Groot PWJ, Brandt BW, Horiuchi H, Ram AFJ, de Koster CG, Klis FM, 2009. Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **46**, S72-S81.

- De Groot PWJ, Hellingwerf KJ, Klis FM, 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781-796.
- De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM, 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 657-675.
- De Groot PWJ, *et al.*, 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* **2**, 124-142.
- De Hallewin G, Schirra M, Manueddu E, Piga A, Ben-Yehoshua S, 1999. Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. *Journal American Society Horticultural Science* **124**, 702-707.
- De Lucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ, 1997. Fungicidal activity of Cecropin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 481-483.
- Debono M, Gordee RS, 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annual Review of Microbiology* **48**, 471-497.
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB, 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo Journal* **19**, 5157-5166.
- Denning DW, 2002. Echinocandins: A new class of antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 889-891.
- Deshpande N, Wilkins MR, Packer N, Nevalainen H, 2008. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* **18**, 626-637.
- Dielbandhosing SK, Zhang H, Caro LH, van der Vaart JM, Klis FM, Verrips CT, Brul S, 1998. Specific cell wall proteins confer resistance to Nisin upon yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4047-4052.
- Donlan RM, Costerton JW, 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193.
- Dupres V, Alsteens D, Wilk S, Hansen B, Heinisch JJ, Dufrene YF, 2009. The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature Chemical Biology* **5**, 857-862.
- Dutton JR, Johns S, Miller BL, 1997. StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo Journal* **16**, 5710-5721.
- Ecker M, Mrsa V, Hagen I, Deutzmann R, Strahl S, Tanner W, 2003. O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *Embo Reports* **4**, 628-632.
- Eckert JW, Ogawa JM, 1985. The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 421-454.
- Ernst JF, Prill SKH, 2001. O-glycosylation. *Medical Mycology* **39**, 67-74.

- Fang FC, 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Review Microbiology* **2**, 820-832.
- Fang W, Ding W, Wang B, Zhou H, Ouyang H, Ming J, Jin C, 2010. Reduced expression of the O-mannosyltransferase 2 (AfPmt2) leads to deficient cell wall and abnormal polarity in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* **20**, 542-552.
- Fernández-Álvarez A, Elías-Villalobos A, Ibeas JI, 2009. The O-Mannosyltransferase *PMT4* is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **21**, 3397-3412.
- Fernández-Álvarez A, Elías-Villalobos A, Ibeas JI, 2010. Protein glycosylation in the phytopathogen *Ustilago maydis*: From core oligosaccharide synthesis to the ER glycoprotein quality control system, a genomic analysis. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 727-735.
- Fernández-Álvarez A, Marin-Menguiano M, Lanver D, Jimenez-Martin A, Elías-Villalobos A, Pérez-Pulido AJ, Kahmann R, Ibeas JI, 2012. Identification of O-mannosylated virulence factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens* **8**.
- Fields GB, Noble RL, 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **34**, 161-214.
- Fisher M, Henk DA, Briggs CJ, Browstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ, 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Mycoses* **55**, 79-80.
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M, Latgé JP, 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 27594-27607.
- Francois IEJA, Aerts AM, Cammue BPA, Thevissen K, 2005. Currently used antimycotics: Spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Current Drug Targets* **6**, 895-907.
- Fujimura M, Ideguchi M, Minami Y, Watanabe K, Tadera K, 2005. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP1 and Pp-AMP2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**, 642-645.
- Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H, 2009. Class III Chitin Synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* Localizes at the Sites of Polarized Cell Wall Synthesis and Is Required for Conidial Development. *Eukaryotic Cell* **8**, 945-956.
- Futagami T, Nakao S, Kido Y, Oka T, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T, Furukawa K, Goto M, 2011. Putative stress sensors WscA and WscB are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress tolerance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **10**, 1504-1515.
- Gamberi T, Cavalieri D, Magherini F, Mangoni L, De Filippo C, Borro M, Gentile G, Simmaco M, Modesti A, 2007. An integrated analysis of the effects of Esculentin 1-

21 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1774**, 688-700.

Gandía M, Harries E, Marcos JF, 2012. Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Biology* **116**, 654-664.

Ganz T, 2003. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**, 710-720.

Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang JH, Rommens CMT, 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* **18**, 1307-1310.

García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J, 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15183-15195.

Gemmill TR, Trimble RB, 1999a. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 227-237.

Gemmill TR, Trimble RB, 1999b. *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0–2Man1–3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**, 507-515.

Gentzsch M, Immervoll T, Tanner W, 1995. Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein O-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Letters* **377**, 128-130.

Gentzsch M, Tanner W, 1996. The PMT gene family: Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *The EMBO Journal* **15**, 5752-5759.

Gentzsch M, Tanner W, 1997. Protein O-glycosylation in yeast: Protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**, 481-486.

Gietz D, Stjean A, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH, 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 1425-1425.

Girrbach V, Strahl S, 2003. Members of the evolutionarily conserved PMT family of Protein O-Mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12554-12562.

Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S, 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: Protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19288-19296.

González-Candelas L, Alamar S, Sánchez-Torres P, Zacarías L, Marcos JF, 2010. A transcriptomic approach highlights induction of secondary metabolism in citrus fruit in response to *Penicillium digitatum* infection. *BMC Plant Biology* **10**, 194.

Górka-Niec W, Pniewski M, Kania A, Perlinska-Lenart U, Palamarczyk G, Kruszewska JS, 2008. Disruption of *Trichoderma reesei* gene encoding protein O-

mannosyltransferase I results in a decrease of the enzyme activity and alteration of cell wall composition. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 251-259.

Goto M, 2007. Protein O-glycosylation in fungi: Diverse structures and multiple functions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **71**, 1415-1427.

Goto M, Harada Y, Oka T, Matsumoto S, Takegawa K, Furukawa K, 2009. Protein O-mannosyltransferase B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **8**, 1465-1474.

Goto M, Tsukamoto M, Kwon I, Ekino K, Furukawa G, 1999. Functional analysis of O-linked oligosaccharides in threonine/serine-rich region of *Aspergillus* glucoamylase by expression in mannosyltransferase-disruptants of yeast. *European Journal of Biochemistry* **260**, 596-602.

Gun LD, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS, 1999. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**, 646-651.

Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V, 2007. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2128-2134.

Hancock REW, Sahl HG, 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* **24**, 1551-1557.

Harris M, Mora-Montes HM, Gow NAR, Coote PJ, 2009. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology* **155**, 1058-1070.

Harris SD, Hamer L, Sharpless KE, Hamer JE, 1997. The *Aspergillus nidulans* sepA gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *The EMBO Journal* **16**, 3474-3483.

Harris SD, Hofmann AF, Tedford HW, Lee MP, 1999. Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **151**, 1015-1025.

Harris SD, Morrell JL, Hamer JE, 1994. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**, 517-532.

Heesen St, Lehle L, Weissmann A, Aebi M, 1994. Isolation of the *ALG5* locus encoding the UDP-glucose: dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **224**, 71-79.

Hegedüs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F, 2011. The paf gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology* **51**, 253-262.

Heise B, van der Felden J, Kern S, Malcher M, Brückner S, Mösch H-U, 2010. The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and independent mechanisms. *Eukaryotic Cell* **9**, 514-531.

- Helenius A, Aebi M, 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry* **73**, 1019-1049.
- Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG, 2001. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 14637-14642.
- Henriques ST, Melo MN, Castanho MARB, 2006. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? *Biochemical Journal* **399**, 1-7.
- Hoi JWS, Dumas B, 2010. Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryotic Cell* **9**, 480-485.
- Holmes GJ, Eckert JW, 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* **89**, 716-721.
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG, 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* **106**, 7-16.
- Hutzler J, Schmid M, Bernard T, Henrissat B, Strahl S, 2007. Membrane association is a determinant for substrate recognition by *PMT4* protein O-mannosyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**, 7827-7832.
- Ibeas JI, Lee H, Damsz B, Prasad DT, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML, 2000. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant Journal* **23**, 375-383.
- Ichinomiya M, Ohta A, Horiuchi H, 2005. Expression of asexual developmental regulator gene *abaA* is affected in the double mutants of classes I and II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **48**, 171-183.
- Im YJ, Idkowiak-Baldys J, Thevissen K, Cammue BPA, Takemoto JY, 2003. IPT1-independent sphingolipid syringomycin E and biosynthesis and yeast inhibition by plant defensin DmAMP1. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 199-203.
- Immervoll T, Gentsch M, Tanner W, 1995. *PMT3* and *PMT4*, two new members of the protein O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1345-1351.
- Ingham AB, Moore RJ, 2007. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **47**, 1-9.
- Jang WS, Bajwa JS, Sun JN, Edgerton M, 2010. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **77**, 354-370.
- Jang WS, Li XWS, Sun JNN, Edgerton M, 2008. The P-113 fragment of Histatin 5 requires a specific peptide sequence for intracellular translocation in *Candida*

- albicans*, which is independent of cell wall binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 497-504.
- Jansen G, Wu C, Schade B, Thomas DY, Whiteway M, 2005. Drag & Drop cloning in yeast. *Gene* **344**, 43-51.
- Jarver P, Langel U, 2006. Cell-penetrating peptides- A brief introduction. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1758**, 260-263.
- Jiang J, Yun Y, Liu Y, Ma Z, 2012. FgVELB is associated with vegetative differentiation, secondary metabolism and virulence in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 653-662.
- Jin C, 2012. Protein glycosylation in *Aspergillus fumigatus* is essential for cell wall synthesis and serves as a promising model of multicellular eukaryotic development. *International Journal of Microbiology* **2012**, 654251.
- Jung HJ, Park Y, Hahm KS, Lee DG, 2006. Biological activity of Tat (47-58) peptide on human pathogenic fungi. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**, 222-228.
- Jurado LA, Coloma A, Cruces J, 1999. Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (*POMT1*) encoding a putative protein-O-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* **58**, 171-180.
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Gorz R, Burgstaller W, Leiter E, Marx F, 2003. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Archives of Microbiology* **180**, 204-210.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM, 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular Microbiology* **35**, 601-611.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM, 1999. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta-1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology* **31**, 1835-1844.
- Khang CH, Park SY, Lee YH, Kang SC, 2005. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 483-492.
- Khang CH, Park SY, Rho HS, Lee YH, Kang S, 2007. Filamentous Fungi (*Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*). *Methods in Molecular Biology* **344**, 403-420.
- Kig C, Temizkan G, 2009. Nitric oxide as a signaling molecule in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma* **238**, 59-66.
- Kimura T, Komiyama T, Furuichi Y, Iimura Y, Karita S, Sakka K, Ohmiya K, 1999. N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 176-184.

- Klis F, Ram A, De Groot P, 2007. A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. *Biology of the Fungal Cell. The Mycota* **VIII**, 97-120.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ, 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.
- Klutts J, 2006. Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. *FEMS Yeast Research* **6**, 499-512.
- Knauer R, Lehle L, 1999. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 259-273.
- Köhler T, Wesche S, Taheri N, Braus GH, Mösch H-U, 2002. Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryotic Cell* **1**, 673-686.
- Koo JC, *et al.*, 2004. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1669-1680.
- Kotz A, Wagener J, Engel J, Routier FoH, Echtenacher B, Jacobsen I, Heesemann J, Ebel F, 2010. Approaching the secrets of N-glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: Characterization of the AfOch1 protein. *PLoS ONE* **5**, e15729.
- Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L, Jr., 2001. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**, 3016-3026.
- Kriangkripipat T, Momany M, 2009. *Aspergillus nidulans* Protein O-Mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryotic Cell* **8**, 1475-1485.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL, 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal Molecular Biology* **305**, 567-580.
- Kukuruzinska MA, Lennon-Hopkins K, 1999. *ALG* gene expression and cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 359-372.
- Kukuruzinska MA, Lennon K, 1994. Growth-related coordinate regulation of the early N-glycosylation genes in yeast. *Glycobiology* **4**, 437-443.
- Lacadena J, *et al.*, 1995. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**, 273-281.
- Lanver D, Mendoza-Mendoza A, Brachmann A, Kahmann R, 2010. Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-2101.
- Larson TM, Kendra DF, Busman M, Brown DW, 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases *CHS5* and *CHS7* are required for normal growth and pathogenicity. *Current Genetics*.
- Latgé JP, 2007. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* **66**, 279-290.

- Latgé JP, Mouyna I, Tekaia F, Beauvais A, Debeaupuis JP, Nierman W, 2005. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* **43**, S15-S22.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA, 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**, 963-967.
- Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S, 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* **48**, 113-121.
- Lehle L, Strahl S, Tanner W, 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 6802-6818.
- Leitão EA, Bittencourt VCB, Haido RMT, Valente AP, Peter-Katalinic J, Letzel M, de Souza LM, Barreto-Bergter E, 2003. β -Galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology* **13**, 681-692.
- Leiter E, *et al.*, 2005. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2445-2453.
- Lengeler K, Tielker D, Ernst J, 2008. Protein O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 528-544.
- Lesage G, Sdicu AM, Menard P, Shapiro J, Hussein S, Bussey H, 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**, 35-49.
- Levin DE, 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 262-291.
- Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M, 2003. *Candida albicans* Ssa1/2p Is the cell envelope binding protein for human salivary Histatin 5. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 28553-28561.
- Li Y, Zhang L, Wang D, Zhou H, Ouyang H, Ming J, Jin C, 2008. Deletion of the *msdS/AfmsdC* gene induces abnormal polarity and septation in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **154**, 1960-1972.
- Lindgren ME, 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences* **21**, 99-103.
- Lis M, Fuss JR, Bobek LA, 2009. Exploring the mode of action of antimicrobial peptide MUC712-mer by fitness profiling of *Saccharomyces cerevisiae* genomewide mutant collection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 3762-3769.
- Lis M, Liu TT, Barker KS, Rogers PD, Bobek LA, 2010. Antimicrobial peptide MUC7 12-mer activates the calcium/calcieneurin pathway in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* **10**, 579-586.

- Liu TT, Lee REB, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, Rogers PD, 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2226-2236.
- Liu X, Wang J, Gou P, Mao C, Zhu ZR, Li H, 2007. In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 223-229.
- Lobo DS, et al., 2007. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* **46**, 987-996.
- Lommel M, Bagnat M, Strahl S, 2004. Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-Mannosylation mutants. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 46-57.
- Lommel M, Strahl S, 2009. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**, 816-828.
- López-García B, Gandía M, Muñoz A, Carmona L, Marcos JF, 2010a. A genomic approach highlights common and diverse effects and determinants of susceptibility on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to distinct antimicrobial peptides. *BMC Microbiology* **10**, 289.
- López-García B, González-Candelas L, Pérez-Payá E, Marcos JF, 2000. Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 837-846.
- López-García B, Moreno AB, San Segundo B, De los Ríos V, Manning JM, Gavilanes JG, Martínez-del-Pozo A, 2010b. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **70**, 206-210.
- López-García B, Pérez-Payá E, Marcos JF, 2002. Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2453-2460.
- López-García B, Ubhayasekera W, Gallo RL, Marcos JF, 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **356**, 107-113.
- López-García B, Veyrat A, Pérez-Payá E, González-Candelas L, Marcos JF, 2003. Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *International Journal of Food Microbiology* **89**, 163-170.
- Lupetti A, Paulusma-Annema A, Senesi S, Campa M, van Dissel JT, Nibbering PH, 2002. Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1634-1639.

- Lussier M, Gentzsch M, Sdicu AM, Bussey H, Tanner W, 1995. Protein O-glycosylation in yeast. The *PMT2* gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2770-2775.
- Lussier M, *et al.*, 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- Macarasin D, Cohen L, Eick A, Rafael G, Belausov E, Wisniewski M, Droby S, 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology* **97**, 1491-1500.
- Magan N, Aldred D, 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal Food Microbiology* **119**, 131-139.
- Mania D, Hilpert K, Ruden S, Fischer R, Takeshita N, 2010. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 7102-7108.
- Marcet-Houben M, Ballester AR, de la Fuente B, Harries E, Marcos JF, González-Candelas L, Gabaldón T, 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the major postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* **13**, 646.
- Marcos JF, Gandía M, 2009. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opinion on Drug Discovery* **4**, 659-671.
- Marcos JF, González-Candelas L, Zacarías L, 2005. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2183-2193.
- Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B, 2008. Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 273-301.
- Markovich S, Yekutieli A, Shalit I, Shadkchan Y, Osherov N, 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3871-3876.
- Martín-Blanco E, García-Bellido A, 1996. Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6048-6052.
- Martín-Urdíroz M, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Martínez del Pozo A, Roncero MIG, 2009. Differential toxicity of antifungal protein AFP against mutants of *Fusarium oxysporum*. *International Microbiology* **12**, 115-121.
- Martín-Urdíroz M, Roncero MI, González-Reyes JA, Ruiz-Roldán C, 2008. ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* **7**, 112-121.

- Marx F, Binder U, Leiter É, Pócsi I, 2008. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 445-454.
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stoffler G, Lottspeich F, Redl B, 1995. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**, 167-171.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW, 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **11**, 3445-3458.
- Maurya IK, Pathak S, Sharma M, Sanwal H, Chaudhary P, Tupe S, Deshpande M, Chauhan VS, Prasad R, 2011. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* **32**, 1732-1740.
- Mello EO, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Santos IS, Da Cunha M, Santa-Catarina C, Gomes VM, 2011. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current Microbiology* **62**, 1209-1217.
- Meyer V, 2008. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**, 17-28.
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJ, Ram AFJ, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* **48**, 1-17.
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJ, Ram AFJ, 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols* **3**, 1671-1678.
- Mochon AB, Liu HP, 2008. The antimicrobial peptide Histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLoS Pathogens* **4**, e1000190.
- Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high-molecular-weight Dna from filamentous fungi, fruit bodies, and infected-plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**, 6115-6116.
- Montesinos E, 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters* **270**, 1-11.
- Mora-Montes HM, *et al.*, 2007. Endoplasmic reticulum α -glucosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic Cell* **6**, 2184-2193.
- Mora-Montes HM, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro JC, Gow NAR, Flores-Carreón A, López-Romero E, 2009. Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiology* **4**, 1167-1183.

- Moreno AB, Martínez del Pozo A, San Segundo B, 2006. Biotechnologically relevant enzymes and proteins - Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 883-895.
- Morton CO, Dos Santos SC, Coote P, 2007a. An amphibian-derived, cationic, α -helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Molecular Microbiology* **65**, 494-507.
- Morton CO, Hayes A, Wilson M, Rash BM, Oliver SG, Coote P, 2007b. Global phenotype screening and transcript analysis outlines the inhibitory mode(s) of action of two amphibian-derived, α -helical, cationic peptides on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 3948-3959.
- Motteram J, Lovegrove A, Pirie E, Marsh J, Devonshire J, van de Meene A, Hammond-Kosack K, Rudd JJ, 2011. Aberrant protein N-glycosylation impacts upon infection-related growth transitions of the haploid plant-pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Microbiology* **81**, 415-433.
- Mouyna I, *et al.*, 2010. Members of protein O-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Molecular Microbiology* **76**, 1205-1221.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S, 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**, 173-180.
- Muñoz A, 2008. Caracterización de distintos péptidos antimicrobianos con actividad frente a hongos fitopatógenos de interés agroalimentario, *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Muñoz A, Gandía M, Harries E, Carmona L, Read ND, Marcos JF, 2013a. Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model. *Fungal Biology Reviews* **26**, 146-155.
- Muñoz A, Harries E, Contreras-Valenzuela A, Carmona L, Read ND, Marcos JF, 2013b. Two functional motifs define the interaction, internalization and toxicity of a small cell penetrating antifungal peptide. *PLoS ONE* **8** e54813.
- Muñoz A, López-García B, Marcos JF, 2006. Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 3847-3855.
- Muñoz A, López-García B, Marcos JF, 2007a. Comparative study of antimicrobial peptides to control citrus postharvest decay caused by *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 8170-8176.
- Muñoz A, López-García B, Pérez-Payá E, Marcos JF, 2007b. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 172-177.

- Muñoz A, Marcos JF, 2006. Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 1199-1207.
- Muñoz A, Marcos JF, Read ND, 2012. Concentration-dependent mechanisms of cell penetration and killing by the de novo designed antifungal hexapeptide PAF26. *Molecular Microbiology* **85(1)**, 89-106.
- Nair R, Roy I, Bucke C, Keshavarz T, 2009. Quantitative PCR study on the mode of action of oligosaccharide elicitors on penicillin G production by *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 1131-1139.
- Nakamura T, Ando A, Takagi H, Shima J, 2007. *EOS1*, whose deletion confers sensitivity to oxidative stress, is involved in N-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **353**, 293-298.
- Nakamura T, Takahashi S, Takagi H, Shima J, 2010. Multicopy suppression of oxidant-sensitive *eos1* mutation by *IZH2* in *Saccharomyces cerevisiae* and the involvement of Eos1 in zinc homeostasis. *FEMS Yeast Research* **10**, 259-269.
- Nakaya K, Omata K, Okahashi I, Nakamura Y, Kolekenbrock H, Ulbrich N, 1990. Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *European Journal of Biochemistry* **193**, 31-38.
- Narasimhan ML, *et al.*, 2005. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Molecular Cell* **17**, 171-180.
- Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun DJ, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA, 2001. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Molecular Cell* **8**, 921-930.
- Narayananamy P, 2006. *Postharvest pathogens and disease management*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Nicolas P, 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS Journal* **276**, 6483-6496.
- Nicolas P, El Amri C, 2009. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1788**, 1537-1550.
- Nunes C, Usall J, Manso T, Torres R, Olmo M, García JM, 2007. Effect of high temperature treatments on growth of *Penicillium* spp. and their development on 'Valencia' oranges. *Food Science and Technology International* **13**, 63-68.
- Oard S, Rush MC, Oard JH, 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 169-180.
- Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F, 2003. Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive *Aspergilli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 3598-3601.

- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR, 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* **11**, 272-279.
- Oka T, Hamaguchi T, Sameshima Y, Goto M, Furukawa K, 2004. Molecular characterization of protein O-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **150**, 1973-1982.
- Oka T, Sameshima Y, Koga T, Kim H, Goto M, Furukawa K, 2005. Protein O-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in O-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology* **151**, 3657-3667.
- Olson GM, Fox DS, Wang P, Alspaugh JA, Buchanan KL, 2007. Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **6**, 222-234.
- Orlean P, 1990. Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O-mannosylation, and N-glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 5796-5805.
- Otvos L, Jr., 2005. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *Journal of Peptide Science* **11**, 697-706.
- Ouedraogo JP, Hagen S, Spielvogel A, Engelhardt S, Meyer V, 2011. Survival strategies of yeast and filamentous fungi against the antifungal protein AFP. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13859-13868.
- Owens LD, Heutte TM, 1997. A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 525-528.
- Palou L, Usall J, Smilanick JL, Aguilar MJ, Viñas I, 2002. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Pest Management Science* **58**, 459-466.
- Pardo M, Monteoliva L, Vázquez P, Martínez R, Molero G, Nombela C, Gil C, 2004. *PST1* and *ECM33* encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* **150**, 4157-4170.
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC, 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 8245-8250.
- Park SC, Kim JY, Jeong C, Yoo S, Hahm KS, Park Y, 2010. A plausible mode of action of pseudin-2, an antimicrobial peptide from *Pseudis paradoxa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1808**, 171-182.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Chalupka A, Ringstad L, Malmsten M, 2009. End-Tagging of Ultra-Short Antimicrobial Peptides by W/F Stretches to Facilitate Bacterial Killing. *PLoS ONE* **4**.

- Pérez-Nadales E, Di Pietro A, 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **23**, 1171-1185.
- Peschel A, Sahl HG, 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 529-536.
- Petit J, Boisseau P, Arveiler B, 1994. Glucanex: a cost-effective yeast lytic enzyme. *Trends in Genetics* **10**, 4-5.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**.
- Philip B, Levin DE, 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 271-280.
- Porat R, Daus A, Weiss B, Cohen L, Droby S, 2002. Effects of combining hot water, sodium bicarbonate and biocontrol on postharvest decay of citrus fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **77**, 441-445.
- Porat R, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE, Droby S, 2003. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by beta-aminobutyric acid. *European Journal Of Plant Pathology* **109**, 901-907.
- Powers JPS, Hancock REW, 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Prill SKH, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schroppel K, Ernst JF, 2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Molecular Microbiology* **55**, 546-560.
- Pringle JR, 1991. Staining of bud scars and other cell-wall chitin with calcofluor. *Methods in Enzymology* **194**, 732-735.
- Proszynski TJ, Simons K, Bagnat M, 2004. O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1533-1543.
- Punt P, 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the Hygromycin-B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117-124.
- Ram AFJ, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, Van Den Ende H, Klis FM, 1998. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae*. Results in the release of beta-1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *The Journal of Bacteriology* **180**, 1418-1424.
- Ram AFJ, Klis FM, 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols* **1**, 2253-2256.
- Ramamoorthy V, Zhao XH, Snyder AK, Xu JR, Shah DM, 2007. Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cellular Microbiology* **9**, 1491-1506.

- Rayner JC, Munro S, 1998. Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26836-26843.
- Reinoso-Martin C, Schuller C, Schuetzer-Muehlbauer M, Kuchler K, 2003. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryotic Cell* **2**, 1200-1210.
- Rispail N, *et al.*, 2009. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 287-298.
- Robzyk K, Kassir Y, 1992. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research* **20**, 3790-3790.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarías L, 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6724-6731.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Nuñez F, Benito MJ, Asensio MA, 2010. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* **31**, 541-547.
- Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, Buxton DK, Oppenheim FG, Friden P, 2001. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1367-1373.
- Ruíz-Herrera J, Ortíz-Castellanos L, 2010. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* **10**, 225-243.
- Ruíz-Herrera J, Ortíz-Castellanos L, Martínez AI, León-Ramírez C, Sentandreu R, 2008. Analysis of the proteins involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**, S71-S76.
- Rydlo T, Miltz J, Mor A, 2006. Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *Journal of Food Science* **71**, 125-135.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Torres P, Tuset JJ, 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology* **59**, 159-165.
- Sanders SL, Gentzsch M, Tanner W, Herskowitz I, 1999. O-glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *Journal of Cell Biology* **145**, 1177-1188.

- Sanzani SM, Schena L, Nigro F, De Girolamo A, Ippolito A, 2009. Effect of quercetin and umbelliferone on the transcript level of *Penicillium expansum* genes involved in patulin biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology*.
- Scazzocchio C, 2000. The fungal GATA factors. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 126-131.
- Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ, 1999. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Letters* **446**, 213-217.
- Schmidtchen A, Ringstad L, Kasetty G, Mizuno H, Rutland MW, Malmsten M, 2011. Membrane selectivity by W-tagging of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1808**, 1081-1091.
- Schneider T, *et al.*, 2010. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* **328**, 1168-1172.
- Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Röllinghoff M, Schröppel K, 2000. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **38**, 435-445.
- Sentandreu R, Northcote DH, 1968. The structure of a glycoprotein isolated from the yeast cell wall. *Biochem. J.* **109**, 419-432.
- Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE, 1990. abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell Online* **2**, 731-739.
- Shaw BD, Momany M, 2002. *Aspergillus nidulans* polarity mutant swoA is complemented by protein O-mannosyltransferase pmtA. *Fungal Genetics and Biology* **37**, 263-270.
- Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM, Sorenson D, 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 226-238.
- Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota F, Usall J, Michael IF, 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* **83**, 139-145.
- Smilanick JL, Sorenson D, 2001. Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biology and Technology* **21**, 157-168.
- Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML, 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology* **33**, 141-151.
- Spadaro D, Gullino ML, 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* **91**, 185-194.
- Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG, 1981. Sequence and specificity of 2 anti-bacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248.

- Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W, 1999. Protein O-mannosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 297-307.
- Strahl-Bolsinger S, Immervoll T, Deutzmann R, Tanner W, 1993. *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 8164-8168.
- Strahl-Bolsinger S, Scheinost A, 1999. Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 9068-9075.
- Strahl-Bolsinger S, Tanner W, 1991. Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the dolichyl-phosphate-D-mannose-protein O-D-mannosyltransferase. *European Journal of Biochemistry* **196**, 185-190.
- Strom MB, Rekdal O, Svendsen JS, 2000. Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *Journal of Peptide Research* **56**, 265-274.
- Sun JNN, Li WS, Jang WS, Nayyar N, Sutton MD, Edgerton M, 2008. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. *Molecular Microbiology* **70**, 1246-1260.
- Sun X, Li H, Yu D, 2011a. Complete mitochondrial genome sequence of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* and comparative analysis of closely related species. *FEMS Microbiology Letters* **323**, 29-34.
- Sun X, Wang J, Feng D, Ma Z, Li H, 2011b. PdCYP51B, a new putative sterol 14 α -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**, 1107-1119.
- Szafrański-Schneider E, Swidergall M, Cottier F, Tielker D, Román E, Pla J, Ernst JF, 2012. Msb2 Shedding Protects *Candida albicans* against Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog* **8**.
- Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri Talesh N, Osmani S, Oakley B, 2006. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* **1**, 3111-3120.
- Tanaka N, Fujita Y, Suzuki S, Morishita M, Giga-Hama Y, Shimoda C, Takegawa K, 2005. Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**, 813-820.
- Tanner W, Gentzsch M, Immervoll T, Scheinost A, Strahl-Bolsinger S, 1995. Fungal glycoproteins and their biosynthetic pathway as potential targets for antifungal agents. *Acta Biochimica Polonica* **42**, 505-508.
- Taqarort N, Echairi A, Chaussod R, Nouaim R, Boubaker H, Benaoumar A, Boudyach E, 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 3031-3038.

- Terry LA, Joyce DC, 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* **32**, 1-13.
- Terwillinger TC, Eisenberg D, 1982. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 6016-6022.
- Thevissen K, *et al.*, 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 9531-9536.
- Thevissen K, Francois IEJA, Aerts AM, Winderickx J, Cammue BPA, 2004a. Plant defensin-resistant yeast mutants with increased life-span. *The FASEB Journal* **18**, C304-C304.
- Thevissen K, Francois IEJA, Takemoto JY, Ferket KKA, Meert EMK, Cammue BPA, 2003. DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **226**, 169-173.
- Thevissen K, *et al.*, 2005. *SKN1*, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Letters* **579**, 1973-1977.
- Thevissen K, *et al.*, 2004b. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3900-3905.
- Thevissen K, *et al.*, 2010. Skn1 and Ipt1 negatively regulate autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **303**, 164-168.
- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K, 2002. Plant defensins. *Planta* **216**, 193-202.
- Tillmann A, Gow NAR, Brown AJP, 2011. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Biochemical Society Transactions* **39**, 219-223.
- Timpel C, Strahl-Bolsinger S, Ziegelbauer K, Ernst JF, 1998. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20837-20846.
- Timpel C, Zink S, Strahl-Bolsinger S, Schroppel K, Ernst J, 2000. Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *The Journal of Bacteriology* **182**, 3063-3071.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P, 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Tuset JJ, 1987. *Podredumbres de los frutos cítricos*. Generalitat Valenciana, Conselleria di Agricultura i Pesca, Valencia.
- Tuset JJ, 1999. Perspectivas del control de las podredumbres en la postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola*, 272-280.

- Tuset JJ, Hinarejos C, Mira JL, 2000. Eficacia de los tratamientos postcosecha tolerados en producción integrada en el control de *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*. *Levante Agrícola* **352**, 210-214.
- Tuset JJ, Hinarejos C, Mira JL, Martínez JM, 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la postrecolección. *Levante Agrícola* **337**, 342-347.
- Utermark J, Karlovsky P, 2008. Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. *Protocol Exchange*, doi:10.1038/nprot.2008.1083.
- van den Berg MA, *et al.*, 2008. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology* **26**, 1161-1168.
- van der Weerden NL, Hancock REW, Anderson MA, 2010. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 37513-37520.
- van der Weerden NL, Lay FT, Anderson MA, 2008. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 14445-14452.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034-research0034.
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martínez del Pozo A, San Segundo B, 2001. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1327-1331.
- Vylkova S, Jang WS, Li WS, Nayyar N, Edgerton M, 2007a. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryotic Cell* **6**, 1876-1888.
- Vylkova S, Nayyar N, Li WS, Edgerton M, 2007b. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 154-161.
- Wang A, Sun X., Lin L., Zhang T., Ma Z., Li H., 2012. PdMfs1, a major facilitator superfamily transporter from *Penicillium digitatum*, is partially involved in the imazalil-resistance and pathogenicity. *African Journal of Microbiology Research* **6** 95-105.
- Wang JY, Li HY, 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Journal of Zhejiang University* **9**, 823-828.
- Weber I, Assmann D, Thines E, Steinberg G, 2006. Polar localizing Class V myosin mhitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* **18**, 225-242.

- Weber Y, Prill SKH, Ernst JF, 2004. Pmt-mediated O-mannosylation stabilizes an essential component of the secretory apparatus, Sec20p, in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **3**, 1164-1168.
- Wilmes M, Cammue BPA, Sahl HG, Thevissen K, 2011. Antibiotic activities of host defense peptides: More to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports* **28**, 1350-1358.
- Wilson CL, Wisniewski M, 1994. *Biological control of postharvest diseases*. CRC Press, Boca Raton.
- Willer T, Brandl M, Sipiczki M, Strahl S, 2005. Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Molecular Microbiology* **57**, 156-170.
- Willger SD, Ernst JF, Alspaugh JA, Lengeler KB, 2009. Characterization of the *PMT* gene family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* **4**.
- Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG, 1991. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infection and Immunity* **59**, 2549-2554.
- Yang HY, Tatebayashi K, Yamamoto K, Saito H, 2009. Glycosylation defects activate filamentous growth *Kss1* MAPK and inhibit osmoregulatory *Hog1* MAPK. *The EMBO Journal* **28**, 1380-1391.
- Yeaman MR, Yount NY, 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55.
- Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR, 2006. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers* **84**, 435-458.
- Yount NY, Yeaman MR, 2006. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1758**, 1373-1386.
- Yun DJ, *et al.*, 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**, 7082-7087.
- Zara S, Bakalinsky AT, Zara G, Pirino G, Demontis MA, Budroni M, 2005. *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2934-2939.
- Zasloff M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zhang HY, Zheng XD, Xi YF, 2005. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *Biocontrol* **50**, 331-342.
- Zhang Z, Zhu Z, Ma Z, Li H, 2009. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates. *International Journal of Food Microbiology* **131**, 157-161.

-
- Zheng XD, Zhang HY, Sun P, 2005. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *European Food Research and Technology* **220**, 353-357.
- Zhou H, Hu HY, Zhang LJ, Li RY, Ouyang HM, Ming J, Jin C, 2007. O-mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. *Eukaryotic Cell* **6**, 2260-2268.
- Zhu J, Luther PW, Leng Q, Mixson AJ, 2006. Synthetic histidine-rich peptides inhibit *Candida* species and other fungi in vitro: Role of endocytosis and treatment implications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 2797-2805.