

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**Máster Universitario en Tecnología y Calidad Agroalimentaria**



**La proteína antifúngica PeAfpA:  
optimización de su producción  
biotecnológica y aplicación en patosistemas  
postcosecha**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Julio – 2021**

**AUTORA: Carolina Roperó Pérez**

**DIRECTOR/ES: Daniel Valero Garrido, Paloma Manzanares Mir**



# MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

## VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2020/2021

Director/es del trabajo
Daniel Valero Garrido Paloma Manzanares Mir

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
La proteína antifúngica PeAfpA: optimización de su producción biotecnológica y aplicación en patosistemas postcosecha
Alumno
Carolina Roperó Pérez

Orihuela, a 30 de junio de 2021

DANIEL VALERO GARRIDO  
Firmado digitalmente por DANIEL VALERO GARRIDO  
Fecha: 2021.06.29 21:54:51 +02'00'

MANZANARES MIR PALOMA MARIA - DNI 22691054J  
Firmado digitalmente por MANZANARES MIR PALOMA MARIA - DNI 22691054J  
Fecha: 2021.06.30 08:46:00 +02'00'

Firma/s tutores trabajo



## **MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA**

### **REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Título: La proteína antifúngica PeAfpA: optimización de su producción biotecnológica y aplicación en patosistemas postcosecha

Title: The antifungal protein PeAfpA: optimization of its biotechnological production and application in different post-harvest pathosystems

Modalidad (proyecto/experimental): experimental

Type (project/research): research

Autor/Author: Carolina Roperó Pérez

Director/es/Advisor: Daniel Valero Garrido, Paloma Manzanares Mir

Convocatoria: Julio

Month and year: Julio 2021

Número de referencias bibliográficas/number of references: 39

Número de tablas/Number of tables: 4

Número de figuras/Number of figures: 12

Número de planos/Number of maps: 0

Palabras clave (5 palabras): proteínas antifúngicas, postcosecha, hongo filamentoso, limón, producción biotecnológica

Key words (5 words): antifungal proteins, post-harvest, filamentous fungus, lemon, biotechnological production



## MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

### RESUMEN (mínimo 10 líneas):

La proteína antifúngica PeAfpA de *Penicillium expansum* presenta gran interés agroalimentario debido a su elevada estabilidad y potente actividad antifúngica frente a un amplio rango de hongos fitopatógenos. En este trabajo se han evaluado distintas estrategias biotecnológicas con las que optimizar la producción de PeAfpA en *Penicillium chrysogenum*. Por un lado, la expresión heteróloga del gen de PeAfpA bajo el control de su propio promotor *afpa* ha permitido la correcta secreción y procesado de la proteína en *P. chrysogenum*. La comparación de la cinética de producción a 3, 5, 7 y 10 días respecto a la cepa silvestre *P. expansum* CMP-1 resalta la existencia de un patrón de producción diferencial, que a tiempos cortos es ligeramente superior en la cepa de *P. chrysogenum*. Además, la purificación de PeAfpA mediante cromatografía de intercambio catiónico ha permitido identificar la secreción simultánea de las proteínas PAFB y PAFC en los sobrenadantes líquidos de la cepa sobreproductora. Por otro lado, se ha evaluado la generación de versiones quiméricas de PeAfpA con las que incrementar su rendimiento de producción y actividad antifúngica, para lo que se diseñó una versión dimérica y dos versiones quiméricas basadas en su combinación con la proteína Sca de *Penicillium digitatum*. Sin embargo, ninguno de los transformantes de *P. chrysogenum* fueron capaces de sintetizar las proteínas diseñadas biotecnológicamente. Finalmente, se ha abordado la optimización de las condiciones de inoculación para la ejecución de ensayos de infección *in vivo* con los que evaluar el efecto protector de PeAfpA frente a la infección de *P. digitatum* y *P. italicum* en limones.

### ABSTRACT (10 lines or more):

The antifungal protein PeAfpA from *Penicillium expansum* shows great agri-food interest due to its high stability and potent antifungal activity towards a wide range of phytopathogenic fungi. In this work several biotechnological strategies have been applied in order to optimize PeAfpA production in *Penicillium chrysogenum*. Heterologous expression of PeAfpA under the control of its own promoter *afpa* led to the correct secretion and processing of the protein in *P. chrysogenum*. Likewise, monitoring of PeAfpA production after 3, 5, 7 and 10 days of incubation in comparison to the natural producer *P. expansum* CMP-1 showed a different pattern of production with a slightly higher yield in *P. chrysogenum* at short times. Furthermore, PeAfpA purification by cationic exchange chromatography enabled the identification of both PAFB and PAFC antifungal proteins in the supernatant of the PeAfpA-overproducing *P. chrysogenum* strain. Alternatively, quimeric protein production has been evaluated as a strategy to improve PeAfpA yield and antifungal activity. A dimeric protein and two quimeric combinations based on the fusion with the Sca anionic protein from *Penicillium digitatum* were designed for their bioproduction in *P. chrysogenum*. Nevertheless, none of the transformants were able to synthesize the designed proteins. Finally, optimization of the inoculation conditions for *in vivo* protective assays were carried out in order to evaluate the effect of PeAfpA against *P. digitatum* and *P. italicum* infection in lemon fruits.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Los hongos fitopatógenos y su impacto en el sector agroalimentario .....	1
1.2. Las proteínas antifúngicas (AFPs) de hongos .....	3
1.3. Producción biotecnológica de AFPs.....	5
1.4. Las PeAFPs de <i>Penicillium expansum</i> .....	6
1.5. PeAfpA en el control postcosecha.....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	8
3.2. Clonación de las construcciones quiméricas .....	8
3.2.1. Ensamblaje FungalBraid (FB).....	8
3.2.2. Secuenciación .....	9
3.2.3. Análisis por PCR colonia .....	10
3.2.4. Análisis por restricción enzimática .....	10
3.3. Transformación genética de <i>P. chrysogenum</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT).....	10
3.4. Extracción de DNA genómico de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	11
3.5. Amplificación del DNA genómico por PCR .....	11
3.6. Purificación de la proteína recombinante PeAfpA .....	12
3.7. Western blot.....	12
3.8. Identificación de proteínas mediante huella peptídica .....	13
3.9. Ensayos de protección <i>in vivo</i> en frutos de limón .....	13
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
4.1. Diseño <i>in silico</i> de las proteínas quiméricas de PeAfpA.....	14
4.2. Ensamblaje y generación de transformantes para la bioproducción de las proteínas quiméricas de PeAfpA.....	14
4.3. Evaluación de la capacidad de producción de las proteínas quiméricas .....	20
4.4. Optimización de las condiciones de producción de PeAfpA en el sobreproductor PcMG0052 de <i>P. chrysogenum</i> .....	21
4.5. Efecto protector de PeAfpA en limones frente a <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium italicum</i> .....	24
<b>5. Discusión</b> .....	<b>28</b>
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Agradecimientos</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>33</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los hongos fitopatógenos y su impacto en el sector agroalimentario

Los organismos fitopatógenos son responsables de graves pérdidas económicas asociadas a la producción de cultivos. En el sector hortofrutícola, las pérdidas debidas a fenómenos de deterioro microbiano varían entre el 10% y el 50% de la producción total (Marcos *et al.*, 2008).

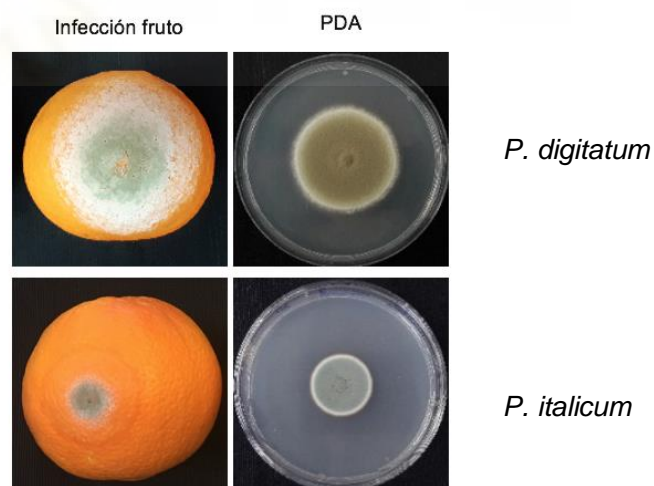
Los hongos destacan como los principales patógenos de las especies vegetales cultivadas para alimentación, existiendo una gran variedad de especies causantes de enfermedades pre y postcosecha. Asimismo, la existencia de hongos filamentosos productores de micotoxinas constituye un importante riesgo para la seguridad alimentaria, comprometiendo tanto la producción animal como la salud humana. Los principales hongos productores de micotoxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, siendo seis los tipos de micotoxinas detectadas mayoritariamente en los alimentos: las aflatoxinas, la ocratoxina A, el deoxinivalenol, las fumonisinas, la zearalenona y la patulina (Alshannaq y Yu, 2017). Anualmente, se estima que hasta un 25% de la producción global de cultivos es descartada a consecuencia de la contaminación por micotoxinas, derivando en pérdidas económicas del orden de billones de dólares para el sector alimentario (Marin *et al.*, 2013).

Entre los hongos fitopatógenos de mayor impacto económico se encuentran *Magnaporthe oryzae*, patógeno de cultivos de arroz, y *Botrytis cinerea*, hongo micotoxigénico con una amplia capacidad de infección a lo largo de la cadena productiva. Existen, además, muchos otros hongos fitopatógenos causantes de pérdidas pre y postcosecha, como *Fusarium graminearum* (cereales), *Fusarium oxysporum* (tomate, algodón y banana) o *Ustilago maydis* (maíz) (Dean *et al.*, 2012).

## 1.2. Infecciones fúngicas postcosecha en frutos cítricos

Los frutos cítricos son uno de los cultivos más relevantes a nivel mundial, con una producción global estimada de 158 millones de toneladas. Solo en España la producción global alcanza los 6 millones de toneladas y las 296 hectáreas de cultivo, siendo el mayor productor en la Unión Europea (FAOSTAT, 2019). Las infecciones fúngicas constituyen una de las principales causas de pérdidas productivas y económicas durante la etapa de post-recolección. Destacan, ante todo, las infecciones causadas por *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, capaces de abarcar hasta un 80% y 30% de las pérdidas totales debidas a infecciones microbianas, respectivamente, en función del estado del fruto y de las condiciones de almacenamiento (El-Otmani *et al.*, 2011).

El hongo ascomiceto *P. digitatum* es considerado el principal patógeno postcosecha de cítricos, siendo responsable de los fenómenos de pudrición verde durante la etapa de conservación y comercialización. Es específico de cítricos, ya que no ha sido descrito en otros sistemas vegetales. Este hongo filamentosso necrotrófico actúa mediante la penetración e infección a partir de heridas físicas preexistentes en la piel de los cítricos. En concreto, la contaminación por *P. digitatum* puede tener lugar durante la recolección, transporte y manipulación, aunque la infección proviene mayoritariamente del campo (Tuset, 1987). Por su parte, *P. italicum* es el segundo hongo fitopatológico más importante en la conservación postcosecha de cítricos, siendo responsable de la conocida como podredumbre azul. Este hongo, además, es capaz de infectar otros tipos de vegetales. Aunque *P. italicum* es más tolerable a las bajas temperaturas, *P. digitatum* invade rápidamente el fruto, de modo que su incidencia es predominante en las condiciones usuales de conservación (El-Otmani *et al.*, 2011). Ambos hongos actúan como patógenos de herida, requiriendo de daños físicos causados durante la recolección, manipulación o distribución de los frutos, así como debidos a condiciones fisiológicas adversas o insectos (Palou, 2014). En ambos casos, la principal sintomatología asociada a la infección es la maceración de los tejidos del fruto, acompañada de la visualización de micelio blanco junto a conidiosporas de color verde (*P. digitatum*) y azul (*P. italicum*), tal y como se aprecia en la Figura 1.



**Figura 1.** (A) Imágenes de fruto de naranja infectado con *P. digitatum* (podredumbre verde) y *P. italicum* (podredumbre azul) tras 7 días post infección. (B) Imágenes del crecimiento de *P. digitatum* (cepa PHI26) y *P. italicum* (cepa PHI1) en medio sólido PDA (potato dextrose agar).

El control de los hongos fitopatógenos de cítricos ha sido efectuado tradicionalmente mediante aplicación de fungicidas químicos durante las etapas de pre y postcosecha. Actualmente, el imazalil es el fungicida mayormente utilizado en la conservación postcosecha de cítricos. Otros de los fungicidas más ampliamente extendidos en el control de las infecciones fúngicas causadas por *P. digitatum* y *P. italicum* incluye el tiabendazol, el ortofenilfenato sódico y el fludioxonil (El-Otmani *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso continuado y, en diversos casos, incorrecto de este tipo de fungicidas ha promovido la aparición de cepas resistentes (Holmes y Eckert, 1999; Sánchez-Torres y Tuset, 2011). Todo ello, unido a las restricciones legislativas existentes entorno a los límites máximos de residuos fitosanitarios permitidos en los productos vegetales y la creciente concienciación ciudadana en materia de medio ambiente y salud, ha potenciado la búsqueda de métodos de control alternativos (Papoutsis *et al.*, 2019).

Por todo ello, el mercado global de fungicidas se encuentra en continuo crecimiento. Sin embargo, son pocos los nuevos compuestos antifúngicos introducidos en los últimos treinta años. Existe, por tanto, una necesidad urgente en la identificación de nuevas moléculas antifúngicas con elevada eficacia, ausencia de toxicidad y modos de acción diferentes a los ya conocidos.

## **1.2. Las proteínas antifúngicas (AFPs) de hongos**

Los péptidos y proteínas antimicrobianas (*AntiMicrobial Peptides*, AMPs) abarcan una amplia clase de compuestos con actividad antimicrobiana directa. Los AMPs son producidos por organismos a lo largo de toda la escala filogenética, desde bacterias hasta hongos, plantas, insectos y animales superiores. En los procariotas, los AMPs forman parte de sistemas de competición por nutrientes. En cambio, en los organismos superiores forman parte de mecanismos primitivos de inmunidad innata contra patógenos microbianos (Michael Zasloff, 2002).

A pesar de la amplia diversidad de AMPs, todos ellos presentan características comunes, independientemente de su origen: son de pequeño tamaño (entre 10 y 50 aminoácidos), catiónicos y con alta proporción de residuos hidrofóbicos. Estos AMPs tienen un gran interés para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos, con la ventaja de poder ser producidos mediante estrategias biotecnológicas (Marcos *et al.*, 2008). El uso de AMPs ha sido reconocido como una alternativa frente al uso indiscriminado de fungicidas químicos en la protección de los cultivos, dada la ausencia de toxicidad y la elevada especificidad de los mismos.



Un grupo particular de AMPs son las llamadas proteínas antifúngicas (*AntiFungal Proteins*, AFPs) secretadas por hongos filamentosos ascomicetos, principalmente de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Meyer, 2008). Las AFPs de origen fúngico pertenecen a un tipo especial de AMPs denominados proteínas ricas en cisteína (*Cysteine Rich Protein*, CRPs), emparentadas filogenéticamente con las defensinas de origen animal y vegetal. Las AFPs son proteínas pequeñas y catiónicas, con una estructura compacta en láminas  $\beta$  estabilizadas mediante puentes disulfuro, lo que les confiere una elevada estabilidad frente al pH, las elevadas temperaturas y la proteólisis. Asimismo, presentan un amplio espectro antifúngico y mecanismos de acción frente a hongos oportunistas de humanos, animales y plantas, así como frente a los principales hongos filamentosos causantes de alteraciones de los alimentos (Delgado *et al.*, 2016; Martínez-Culebras *et al.*, 2021). Por tanto, presentan gran interés biotecnológico debido a su elevada especificidad, estabilidad y actividad antifúngica en el rango micromolar, a la par que toxicidad nula frente a células de plantas y mamíferos (Hegedüs y Marx, 2013).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto la gran variedad de AFPs producidas por distintos tipos de hongos filamentosos, lo que ofrece nuevas oportunidades en el desarrollo de compuestos con capacidad antifúngica. El grupo de Péptidos y Proteínas Bioactivas propuso la clasificación de las AFPs fúngicas en tres clases: A, B y C, en base a su análisis filogenético y otras variables estructurales. Las AFPs están codificadas con una péptido señal en la región N-terminal que incluye una secuencia inicial relacionada con la secreción de las AFPs al espacio extracelular y una secuencia pro-péptido cuya función es todavía controvertida pero para la que se asume la participación en el mantenimiento de la forma inactiva de las AFPs no secretadas (Marx *et al.*, 1995).

Es interesante remarcar que los hongos presentan en su genoma un número variable de genes *afp*. Por ejemplo, el hongo productor de penicilina *Penicillium chrysogenum*, comúnmente utilizado como biofactoría, contiene en su genoma tres genes del tipo *afp*, correspondientes a cada una de las clases filogenéticas y que codifican las proteínas PAF, PAFB y PAFC. De igual modo ocurre en el fitopatógeno postcosecha de frutos de hueso *Penicillium expansum*, cuyo genoma codifica las AFPs PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. En cambio, el patógeno postcosecha de cítricos *Penicillium digitatum* contiene un único gen *afp*, que codifica para la proteína de clase B PdAfpB (Garrigues *et al.*, 2016).

### 1.3. Producción biotecnológica de AFPs

La utilización agroalimentaria de las AFPs requiere de biofactorías seguras, eficientes y económicamente viables con las que permitir su producción a gran escala. De entre los sistemas de expresión evaluados, destaca la utilización de hongos y plantas como factorías biológicas de AFPs y otros AMPs.

Las proteínas antifúngicas AFP de *A. giganteus*, PAF de *P. chrysogenum*, NFAP de *N. fischeri* y PdAfpB de *P. digitatum* han sido clonadas y producidas exitosamente en *Pichia pastoris* (Batta *et al.*, 2009; Galgóczy *et al.*, 2017; López-García *et al.*, 2010). Asimismo, *Penicillium* spp. resalta como una biofactoría apropiada para la expresión biotecnológica de AFPs. En este contexto, se ha desarrollado una plataforma biotecnológica para la producción efectiva de diferentes AFPs en sobrenadantes de cultivo de hongos, basada en la utilización del casete de expresión del gen *paf* de *P. chrysogenum*. Este casete está constituido por la secuencia promotora y terminadora que regula la expresión natural del gen *paf*, así como la secuencia pro-péptido para dirigir su correcto procesamiento y secreción (Sonderegger *et al.*, 2016). El casete *paf* se ha mostrado efectivo en la sobreexpresión de múltiples AFPs, como PAF, mutantes de PAF, NFAP, las proteínas PeAfpB y PeAfpC *P. expansum* y las proteínas PAFB y PAFC de *P. chrysogenum* (Garrigues *et al.*, 2018; Holz knecht *et al.*, 2020; Huber *et al.*, 2018; Sonderegger *et al.*, 2016, 2018). Además, ha permitido la producción heteróloga de distintas AFPs, como la proteína PAF en *P. digitatum* (Garrigues *et al.*, 2017).

Por otro lado, el casete de expresión *paf* ha sido adaptado a un sistema de clonaje modular conocido como FungalBraid (FB), compatible entre hongos y plantas (Hernanz-Koers *et al.*, 2018). La metodología FB permite generar construcciones genéticas complejas en base a los principios de estandarización y modularidad de la biología sintética, facilitando el ensamblaje de construcciones multigénicas en el ámbito de la biotecnología de hongos (Vazquez-Vilar *et al.*, 2020). El casete *paf* de FB ha permitido la producción de la proteína antifúngica de PdAfpB en *P. digitatum*, así como variantes quiméricas de las mismas diseñadas racionalmente (Hernanz-Koers *et al.*, 2018; Heredero *et al.*, 2018).

Recientemente, el grupo de investigación en el que se realiza este trabajo ha adaptado la secuencia promotora y terminadora que controla la expresión del gen *afpa* de *P. expansum* a la metodología FB, generando un nuevo casete de expresión para la bioproducción de AFPs. Hasta el momento, se ha comparado la eficacia de este casete para producir las proteínas PeAfpA de *P. expansum* y PdAfpB de *P. digitatum* utilizando *P. chrysogenum* y *P. digitatum* como factorías (datos no publicados).

#### 1.4. Las PeAFPs de *Penicillium expansum*

*P. expansum* es un hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad del moho azul en diversos tipos de frutos y vegetales, siendo uno de los patógenos más importantes a escala mundial en frutos de hueso como la manzana. Como ya se ha comentado, este hongo filamentoso contiene en su genoma tres genes que codifican para tres AFPs, correspondientes a cada una de las clases filogenéticas: PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. Las proteínas antifúngicas de *P. expansum* han sido satisfactoriamente producidas y caracterizadas en trabajos previos (Gandía *et al.*, 2020; Garrigues *et al.*, 2018).

La proteína PeAfpA alcanza elevados rendimientos de producción de forma natural con la cepa silvestre CMP-1. En concreto, la expresión del gen *afpa* se ve afectada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, dado que frente a la presencia de glucosa la expresión del gen se ve reducida en comparación a la adición de sacarosa. Asimismo, se ha determinado la producción simultánea de PeAfpC en distintos medios de cultivo, aunque con rendimientos mucho menores a PeAfpA (Gandía *et al.*, 2020). En cambio, no se ha detectado la producción natural de la proteína PeAfpB en *P. expansum*. En este contexto, se ha abordado exitosamente la producción de PeAfpB y PeAfpC *P. chrysogenum* mediante estrategias biotecnológicas basadas en el casete de expresión *paf* (Garrigues *et al.*, 2018).

#### 1.5. PeAfpA en el control postcosecha

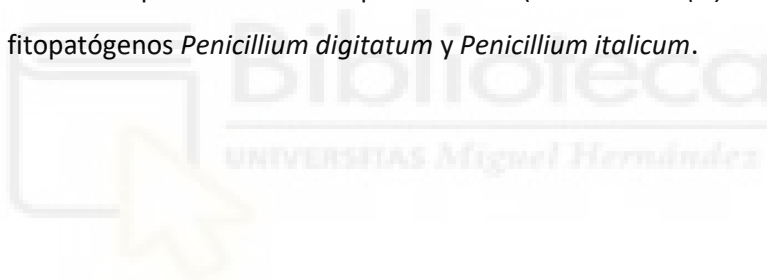
La proteína PeAfpA presenta gran interés agroalimentario debido a su potente capacidad antifúngica frente a hongos fitopatógenos y micotoxigénicos, incluido su propio hongo productor *P. expansum*. Su aplicación en ensayos de infección *in vivo* ha demostrado la capacidad de PeAfpA de proteger los frutos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Navelina) de la podredumbre verde causada por *P. digitatum* durante el almacenamiento postcosecha a concentraciones de 1,5 y 15  $\mu\text{M}$  (Garrigues *et al.*, 2018). Asimismo, recientemente se ha identificado su capacidad protectora frente a la podredumbre causada por *P. expansum* en frutos de manzana (*Malus domestica* cv. Golden Delicious), lo que resalta el potencial de PeAfpA como agente biofungicida en distintos tipos de patosistemas (Gandía *et al.*, 2020). Por otro lado, PeAfpA es capaz de inhibir la infección de *Botrytis cinerea* en plantas y hojas de tomate en concentraciones tan bajas como 1  $\mu\text{M}$ , resaltando su papel potencial en la protección de cultivos vegetales (Garrigues *et al.*, 2018).

## 2. OBJETIVOS

La futura aplicación agroalimentaria de las AFPs requiere de sistemas de producción eficientes. Por tanto, el objetivo global de este trabajo es contribuir a la optimización de la producción biotecnológica de la proteína PeAfpA, así como ensayar su aplicación *in vivo* en nuevos patosistemas postcosecha.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño biotecnológico de proteínas quiméricas basadas en PeAfpA como aproximación para incrementar sus rendimientos de producción y capacidad antifúngica.
2. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción heteróloga de PeAfpA a partir de la cepa transformante PcMG0052 de *Penicillium chrysogenum*. Para ello, se comparará la cinética de producción de PeAfpA con respecto a la cepa silvestre *Penicillium expansum* CMP-1 y se evaluará su procesamiento.
3. Ensayo del efecto protector de PeAfpA en limón (*Citrus limon (L.) Burn*) frente a los hongos fitopatógenos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

Para los ensayos de producción de AFPs se han utilizado las cepas *P. expansum* CECT 20906 (CMP-1) y el transformante *P. chrysogenum* PcMG0052 productor de PeAfpA. La cepa *P. chrysogenum*  $\Delta paf$  fue utilizada como cepa parental para la transformación genética de las versiones quiméricas de PeAfpA. Para los ensayos de infección *in vivo* en limones se utilizaron las cepas de *P. digitatum* CECT20796 (aislado PHI26) y *P. italicum* (aislado PHI1).

La cepa *E. coli* JM109 ha sido utilizada en los protocolos de clonación. Su crecimiento se efectuó en medio sólido Luria Bertani (LB) suplementado con cloranfenicol (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o espectinomycin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para los vectores pUPD2, pDGB3 $\alpha$  y pDGB3 $\Omega$ , respectivamente. El medio LB se suplementó con (IPTG) 0,5 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido (X-Gal) 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la selección de los mutantes positivos. *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 (ATCC<sup>®</sup> BAA101™) fue crecida en medio sólido LB suplementado con rifampicina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para la obtención de conidios asexuales (esporas) las cepas fueron crecidas en medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco 213400) durante 5-7 días a 25 °C. Las esporas se recogieron por rascado, se dispersaron en agua estéril y se filtraron para eliminar restos de micelio. La concentración de conidios se determinó mediante conteo con cámara cuentaglóbulos.

Los transformantes generados para la producción de las versiones quiméricas de PeAfpA fueron crecidos en medio sólido PDA o medio líquido PDB (Scharlau 02-483-500) suplementados con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina como antibiótico de selección. Para la producción de las versiones de PeAfpA quiméricas se inocularon  $10^6$  conidios/mL en 25 mL de medio mínimo de *Penicillium chrysogenum* (PcMM) y se evaluó la producción después de 3 y 5 días de crecimiento a 150 rpm y 25 °C. Los análisis de producción de la proteína PeAfpA se efectuaron mediante inoculación de  $10^6$  conidios/mL en 250 mL de medio mínimo PcMM crecido hasta 10 días a 150 rpm y 25 °C.

#### 3.2. Clonación de las construcciones quiméricas

##### 3.2.1. Ensamblaje FungalBraid (FB)

Las construcciones multigénicas para la expresión de las proteínas quiméricas de PeAfpA fueron diseñadas y ensambladas mediante la metodología de clonación FungalBraid (FB), basada en la ejecución de tres etapas consecutivas: domesticación de las piezas básicas (Nivel 0), ensamblajes multipartitos (Nivel 1) y ensamblajes binarios (Nivel >1). Las piezas básicas

(Nivel 0) fueron diseñadas de acuerdo con la gramática de Golden Braid a través de la herramienta <https://gbcloning.upv.es/>, procediendo a su pedido como genes sintéticos (IDT, Integrated DNA Technologies). Cada pieza fue ligada en el vector de destino pUPD2 mediante una reacción de restricción-ligación en presencia de los enzimas BsmBI (New England Biolabs) y T4 DNA ligasa (Promega) durante 25 ciclos de 2 min a 37 °C y 5 min a 16 °C (Hernanz-Koers *et al.*, 2018). Se llevó a cabo la transformación genética de *E. coli* JM109 mediante choque térmico con un microlitro de cada producto de reacción. Los clones positivos fueron confirmados mediante PCR y secuenciación Sanger con los cebadores OJM524 y OJM525 (Tabla 1). Tras efectuar la extracción de DNA plasmídico con el kit comercial NZYMiniprep (Nzytech) se realizaron las reacciones de digestión-ligación de Nivel 1, utilizando los vectores de destino pDGB $\alpha$ 1R y las condiciones de tiempo y temperatura especificadas en Hernanz-Koers *et al.* (2018). Finalmente se efectuó el ensamblaje de las construcciones multigénicas de Nivel 1 junto al marcador de resistencia a geneticina (FB009) utilizando el vector de destino pDGB $\Omega$ 1. La verificación de los clones positivos asociadas a las reacciones de Nivel 1 y 2 se realizó mediante análisis de restricción y PCR colonia con los cebadores flanqueantes OJM533 y OJM534 (Tabla 1). Los vectores recombinantes finales fueron transformados en la cepa de *A. tumefaciens* AGL-1 mediante electroporación con 1  $\mu$ L de DNA plasmídico a 1440 V/cm.

**Tabla 1. Cebadores utilizados en la confirmación molecular de los plásmidos.**

Nombre	Uso	Secuencia (5'-3')
OJM524	FW	GCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGG
OJM525	RV	CAGGGTGGTGACACCTTGCC
OJM533	FW	CGAGTGGTGATTTGTGCCG
OJM534	RV	CCCGCCAATATATCCTGTCAG

FW: forward, RV: reverso

### 3.2.2. Secuenciación

Las piezas básicas fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger. Se utilizaron 5  $\mu$ L de cada plásmido a una concentración de 30 ng/ $\mu$ L como molde para realizar las reacciones de PCR de secuenciación con el kit comercial BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Se aplicó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo a 94 °C 3 min y 99 ciclos constituidos por una etapa inicial de a 96 °C 10 s, una etapa de hibridación a 55 °C 10 s y una fase de elongación a 60 °C 4 min. La secuenciación de los productos de PCR fue efectuada por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCIE) de la Universidad de Valencia.

### **3.2.3. Análisis por PCR colonia**

Las reacciones de amplificación por PCR colonia se realizaron con el kit Supreme NZYtaq II (NZYTech). Previamente cada colonia fue sembrada en 400  $\mu$ L de medio líquido LB con antibiótico de selección. Para las reacciones se empleó un volumen final de 15  $\mu$ L, de los cuales 7,5  $\mu$ L corresponden al Green Master Mix (2X), 0,5  $\mu$ L a cada uno de los cebadores (10 mM), 1  $\mu$ L a cada colonia y 4,5  $\mu$ L al H<sub>2</sub>O miliQ. El programa de amplificación utilizado consistió en 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C 5 min y 35 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización a 94 °C 1 min, anillamiento a 60 °C 1 min y elongación a 72 °C a razón de 1 kb/min.

### **3.2.4. Análisis por restricción enzimática**

Los plásmidos recombinantes fueron digeridos con enzimas de restricción seleccionadas para generar un patrón de bandas identificativo mediante separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v). Se utilizó el software Benchling (<https://www.benchling.com>) para la selección de las endonucleasas. Las reacciones de digestión fueron mantenidas durante 1 h a 37 °C, añadiendo buffer de restricción, 0,5 unidades de enzima y ~300 ng de DNA en un volumen final de 10  $\mu$ L.

## **3.3. Transformación genética de *P. chrysogenum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)**

La transformación genética de *P. chrysogenum* se realizó siguiendo el protocolo descrito en trabajos previos (Hernanz-Koers *et al.*, 2018; Vazquez-Vilar *et al.*, 2020). Brevemente, se procedió a la mezcla de los cultivos de *A. tumefaciens* (OD<sub>600</sub> ~ 0,6) con 100  $\mu$ L de esporas (10<sup>6</sup> conidios/mL), efectuando su cocultivo en medio CM suplementado con acetosiringona (200 mM) durante 2-3 días a 24 °C. Las membranas de cocultivo fueron entonces transferidas a placas de PDA suplementadas con geneticina (25  $\mu$ g/mL), cefotaxima (200  $\mu$ mol) y moxalactam (100  $\mu$ g/mL). Tras la aparición de colonias, las placas fueron lavadas con 1 mL de agua estéril para resuspender las esporas y 100  $\mu$ L de cada suspensión fueron utilizadas en la inoculación de placas de selección de PDA con geneticina. A partir de las mismas se seleccionaron colonias individuales, procediendo a su inoculación en microplacas de 24 pocillos. Tras 2-3 días a 24°C, las esporas fueron recogidas y resuspendidas en 500  $\mu$ L de agua estéril, procediendo a la obtención de cultivos monospóricos mediante estría en placa de selección. Para cada construcción genética se realizaron cinco réplicas de cocultivo. Paralelamente se realizaron dos transformaciones con las construcciones FB003 (hyg<sup>R</sup>) y FB009 (G418<sup>R</sup>) como control negativo y positivo de la transformación, respectivamente.

### 3.4. Extracción de DNA genómico de *Penicillium chrysogenum*

Para la extracción de DNA genómico se inocularon 100 µL de solución de esporas en 900 µL de medio PDB y se incubaron a 25°C y 200 rpm durante 3 días. Los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Seguidamente se añadieron 500 µL de buffer de extracción (50mM Tris-HCl pH 7.5; 100mM EDTA; 0.5% SDS, 300mM AcNa pH 6) y 5 µL de Proteinasa K y el micelio se pulverizó. Tras incubación durante 1 h a 65 °C, se añadieron 600 µL de solución de fenol:cloroformo (1:1). Las muestras fueron mezcladas por inversión y centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min y 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se transfirieron a tubos de 1,5 mL, añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol a cada muestra. El DNA precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70%. Las muestras se centrifugaron y se descartó el etanol. Finalmente, los pellets se resuspendieron en 35 µL de TE con 0,5 µL de RNasa.

### 3.5. Amplificación del DNA genómico por PCR

La amplificación por PCR fue llevada a cabo para confirmar la correcta integración ectópica de los casetes de producción de las proteínas quiméricas en el genoma de *P. chrysogenum*. Las reacciones de amplificación se realizaron con el kit Supreme NZYtaq II, aplicando las condiciones de tiempo y temperatura descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR del DNA genómico.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Anillamiento	63 °C (OJM620 – OJM621) 49 °C (OJM435 – OJM555)	15 s	
Extensión	72 °C	1 min 30 s	

Se empleó un volumen final de reacción de 15 µL, de los cuales 7,5 µL corresponden al Green Master Mix (2X), 0,5 µL a cada uno de los cebadores (10 mM), 1 µL al DNA (50 ng/uL) y 4,5 µL al H<sub>2</sub>O miliQ. Como controles positivos se utilizaron los vectores recombinantes purificados y como control negativo agua estéril. Se realizaron dos reacciones de amplificación por transformante utilizando las parejas de cebadores OJM620 – OJM621 y OJM435 – OJM555 (Tabla 3).



**Tabla 3. Cebadores utilizados en la confirmación molecular de los transformantes.**

Nombre	Uso	Secuencia (5'-3')
OJM620	FW	GCTTGTCGGCCTTGTGACGCC
OJM621	RV	AGGAAGGCCCGAGGAAGATGC
OJM435	FW	AACTGATATTGAAGGAGCAT
OJM555	RV	TCATCATGCAACATGCATGTA

FW: forward, RV: reverso

### 3.6. Purificación de la proteína recombinante PeAfpA

Se llevó a cabo la purificación de la proteína PeAfpA a partir de la cepa *P. chrysogenum* PcMG0052 mediante cromatografía de intercambio catiónico, siguiendo el protocolo descrito por Garrigues *et al.* (2018). La purificación se realizó a partir de sobrenadantes de cultivo de la cepa productora tras 5 días de crecimiento. Los sobrenadantes filtrados y centrifugados a 10000 rpm durante 45 minutos se dializaron (3.5K MWCO, SnakeSkin™ Dialysis Tubing) frente a tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,5. La cromatografía se efectuó mediante un sistema de purificación ÄKTA equipado con una columna de intercambio catiónico RESOURCE™ S 6 mL (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada en el tampón de diálisis. Para la elución se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0M a 0,5M. La repurificación de PeAfpA y PAFB fue realizada mediante cromatografía de intercambio catiónico en buffer Tris HCl 20 mM pH 8 y gradiente lineal de NaCl de 0M a 0,3M. Las fracciones cromatográficas (6 mL) resultantes se evaluaron mediante gel SDS-PAGE 16%, seleccionando las fracciones de interés que fueron mezcladas, dializadas frente a H<sub>2</sub>O Milli-Q y liofilizadas. La concentración de las proteínas se determinó a partir de su absorbancia ( $A_{280}$ ) y coeficiente de extinción molar (PeAfpA  $\epsilon_{280} = 0,639$  y PAFB  $\epsilon_{280} = 0,458$ ).

### 3.7. Western blot

La detección de las proteínas AFPs en los sobrenadantes de cultivo líquido se efectuó mediante inmunodetección. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 16% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protran 0.20  $\mu$ m NC (GE Healthcare), tal y como se describe en Gandía *et al.* (2020). La detección se llevó a cabo utilizando los anticuerpos de conejo anti-PeAfpA (1:2500), anti-PeAfpC (1:2500) (Garrigues *et al.*, 2018) y anti-PAFB (1:1000) (Huber *et al.*, 2018). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo ECL NA934 horseradish peroxidase donkey anti-rabbit (GE Healthcare), procediendo al

revelado de la membrana mediante detección quimioluminiscente con el agente ECL™ Select Western blotting detection reagent (GE Healthcare). A partir de las imágenes obtenidas en el dispositivo Amersham™ ImageQuant™ 800 se llevó a cabo la cuantificación relativa de PeAfpA mediante densitometría de las señales del western blot con el software ImageJ (v 1.53a).

### **3.8. Identificación de proteínas mediante huella peptídica**

El análisis proteómico de las fracciones purificadas fue realizado por la Unidad de Proteómica (SCSIE) de la Universidad de Valencia. La identificación se llevó a cabo mediante digestión de las muestras con tripsina, analizando los péptidos resultantes con el espectrómetro de masas 5800 MALDI TOF/TOF (ABSciex). La información resultante fue evaluada con el software MASCOT (ABSciex) para proceder a la identificación de las proteínas mediante comparación con la base de datos Uniprot-Penicillium200107.

### **3.9. Ensayos de protección *in vivo* en frutos de limón**

Los ensayos para evaluar el efecto protector de PeAfpA fueron realizados con limones (*Citrus limon* (L.) Burn) variedad 'Primafori'. Una vez recibidos los frutos se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de lejía al 5% durante 5 min. A continuación se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secando hasta su utilización. Para los ensayos de infección se seleccionaron limones de calibre homogéneo que no presentaran daños físicos o podredumbres visibles, aplicando tres réplicas de cuatro-cinco limones por tratamiento (n = 12 - 15).

En cada ensayo se realizaron tres tratamientos: control de herida (frutos heridos con inoculación de agua estéril), control de infección (frutos infectados con *P. digitatum* o *P. italicum*) y aplicación de PeAfpA junto a la solución de esporas del hongo correspondiente. En cada limón se realizaron cuatro heridas distribuidas en el ecuador del fruto de manera equidistante utilizando un punzón de 3 mm de profundidad (n = 48 - 60 heridas). Las heridas fueron inoculadas con 5 µL de agua estéril, 5 µL de la suspensión de esporas o 5 µL de la suspensión de esporas preincubadas durante 24 h con PeAfpA a concentración 15 µM. Se evaluaron distintas concentraciones de inóculo ( $10^4$  -  $5 \times 10^3$  conidios/mL para *P. digitatum* y  $2,5 \times 10^4$  -  $5 \times 10^3$  conidios/mL para *P. italicum*). Tras la inoculación los frutos se mantuvieron a 20 °C y 90% de humedad relativa, monitorizando la incidencia de la infección (porcentaje de heridas totales infectadas) a los 4, 5, 6 y 7 días post-infección (dpi). Los porcentajes obtenidos para cada dpi fueron sometidos a un análisis comparativo de las medias mediante test t de student con distribución bilateral ( $p < 0,05$ ) utilizando el software GraphPad Prism v. 6.01.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Diseño *in silico* de las proteínas quiméricas de PeAfpA

Se diseñaron un total de tres proteínas quiméricas como aproximación para incrementar los rendimientos de producción y/o la actividad antifúngica asociada a la proteína nativa PeAfpA de *P. expansum*.

Por un lado, se generó una versión dimerica de PeAfpA con el objetivo de incrementar su actividad antifúngica. Por otro lado, se generaron dos versiones quiméricas constituidas por la fusión de la proteína PeAfpA con una proteína aniónica de pequeño tamaño conocida como Sca (*secreted cysteine-rich anionic protein* y *scaffold*) secretada naturalmente por *P. digitatum*. La combinación de la secuencia codificante de Sca con el casete de expresión *paf* ha permitido alcanzar elevados rendimientos de producción en *P. chrysogenum* (Garrigues *et al.*, 2020). Este efecto puede estar relacionado con una acción como “*scaffold*” o andamio molecular, por lo que su utilización podría constituir una estrategia útil en la estabilización de proteínas. Por tanto, la fusión de los dominios proteicos de PeAfpA con Sca tenía como objetivo evaluar el incremento de los rendimientos de producción biotecnológica de PeAfpA. Para ello se diseñaron dos proteínas quiméricas con Sca en posición N y C-terminal. Además, en las tres proteínas se incluyó una secuencia espaciadora (*linker*) que permitiese mantener la flexibilidad y el plegamiento, para lo que se seleccionó el péptido APKKVEP de la defensina natural dimerica MtDef5 (Islam *et al.*, 2017).

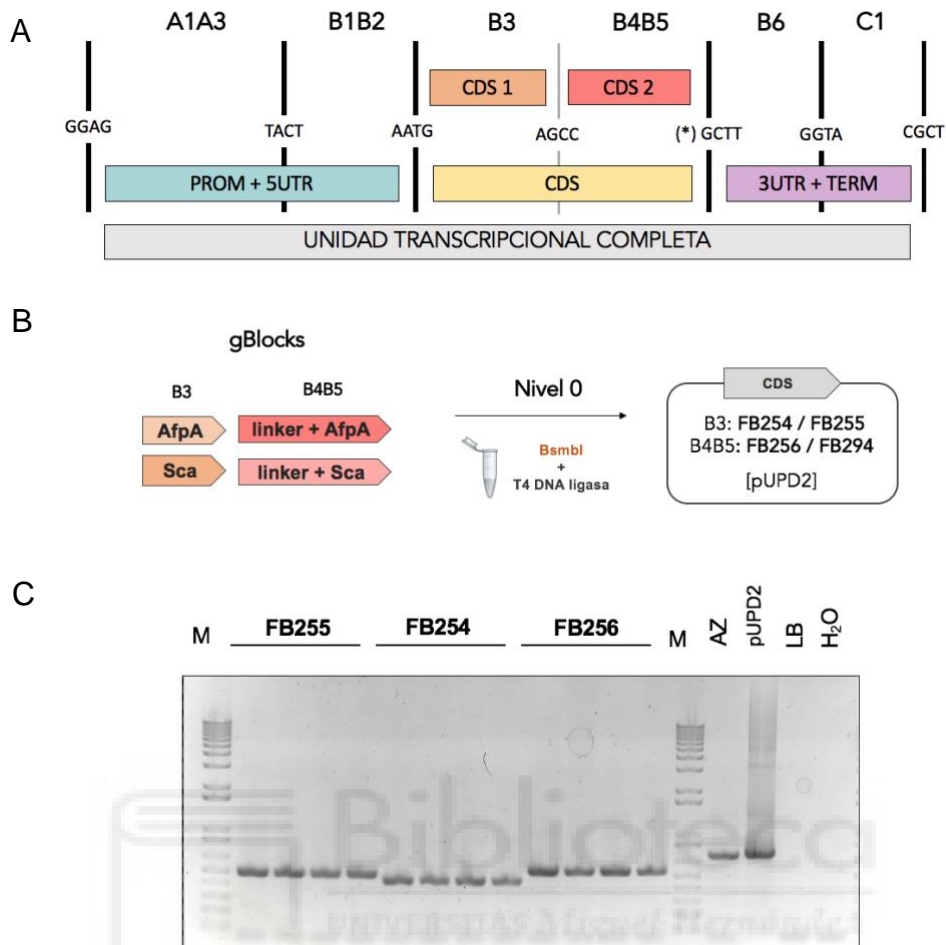
### 4.2. Ensamblaje y generación de transformantes para la bioproducción de las proteínas quiméricas de PeAfpA

La obtención de las cepas de *P. chrysogenum* transformantes para cada una de las proteínas quiméricas se realizó mediante el sistema de ensamblaje modular FB. El conjunto de construcciones genéticas generadas para obtener los vectores recombinantes finales queda resumido en la Tabla 4.

**Tabla 4. Plásmidos FB para la producción de proteínas quiméricas.**

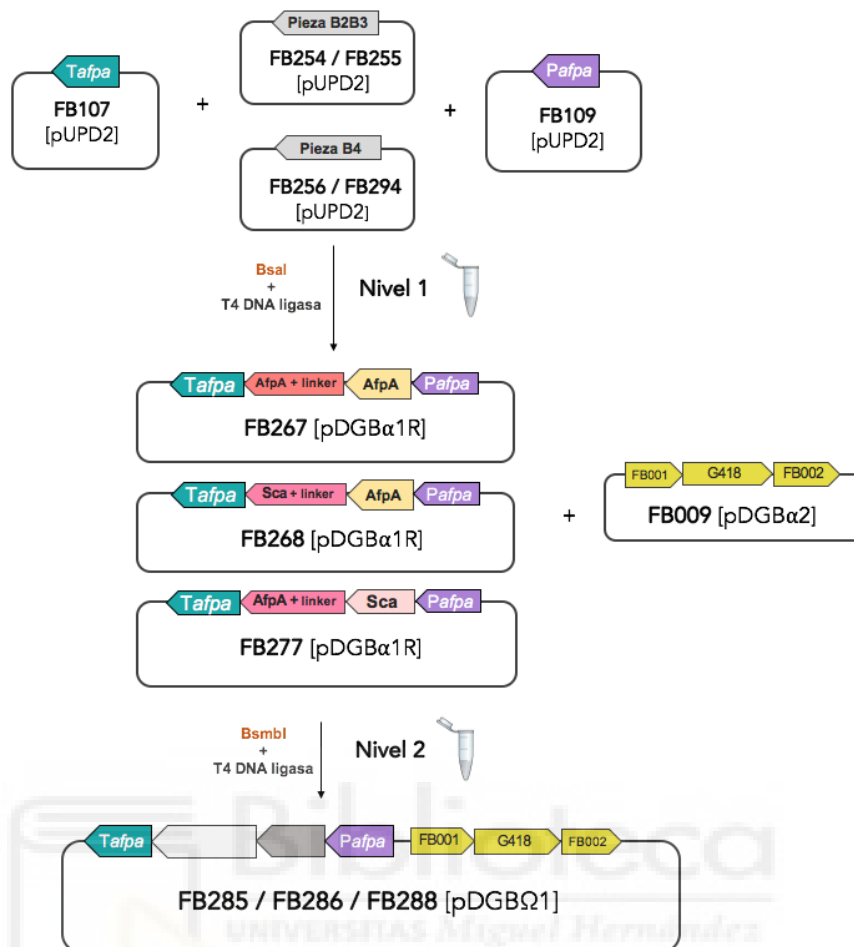
Plásmido	Construcción genética	Vector FB
FB254	Linker::PeAfpA [B4B5]	pUPD2
FB255	Linker::Sca [B4B5]	pUPD2
FB256	PeAfpA [B3]	pUPD2
FB294	Sca [B3]	pUPD2
FB267	FB107::FB256::FB254::FB109	pDGB3 $\alpha$ 1R
FB268	FB107::FB256::FB255::FB109	pDGB3 $\alpha$ 1R
FB277	FB107::FB294::FB254::FB109	pDGB3 $\alpha$ 1R
FB285	FB267 + FB009	pDGB3 $\Omega$ 1
FB286	FB268 + FB009	pDGB3 $\Omega$ 1
FB288	FB277 + FB009	pDGB3 $\Omega$ 1

En primer lugar, se llevó a cabo la “domesticación” de las secuencias codificantes de PeAfpA y Sca, etapa basada en la adición de secuencias de reconocimiento que permiten insertar las piezas genéticas en el vector pUPD2 y determinar la posición que tomará cada pieza en los ensamblajes posteriores. En total se diseñaron cuatro construcciones básicas (FB254, FB255, FB256 y FB294) para abarcar la localización de PeAfpA y Sca en posición N-terminal (CDS 1, categoría B3) y C-terminal (CDS 2, categoría B4B5) siguiendo la gramática de FB (Figura 2A). En las piezas B4B5 se eliminó el codón de inicio, así como las regiones codificantes del propéptido y péptido señal. Asimismo, la secuencia codificante del espaciador APKKVEP (5' GCCCCAAGAAGGTCGAGCCC 3') se adicionó en los extremos 5' de las piezas B4B5. Tal y como se esquematiza en la Figura 2B, cada una de las piezas básicas fueron introducidas en el vector de destino pUPD2. Su correcta integración se confirmó mediante PCR colonia (Figura 2C) y secuenciación Sanger a partir de colonias independientes.



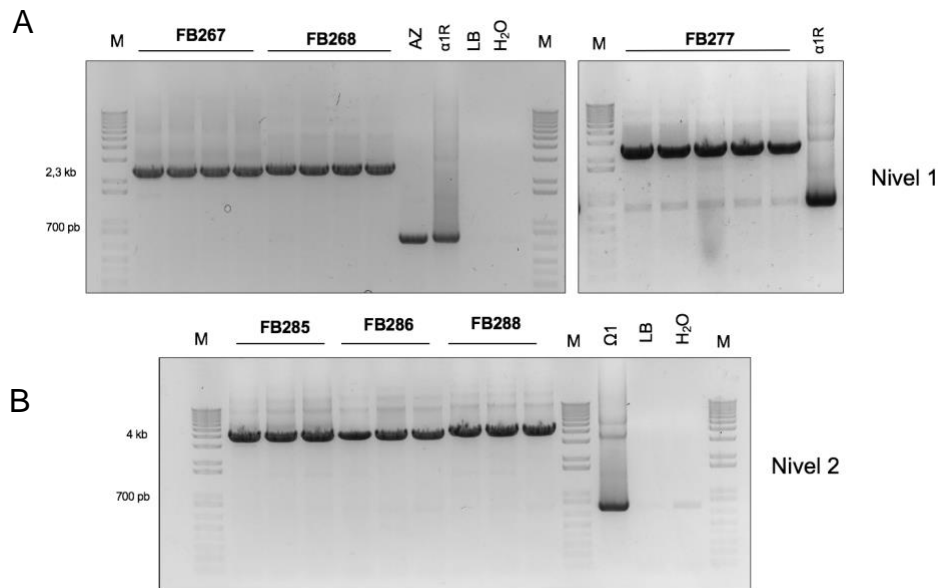
**Figura 2. Domesticación de las piezas genéticas básicas.** (A) Gramática FB, indicando las secuencias identificadoras de cada categoría (B) Esquema de la reacción de digestión-ligación (Nivel 0) para la inserción de las piezas en el vector de destino pUPD2 (C) Verificación del tamaño esperado para las piezas básicas FB254, FB255 y FB256 mediante amplificación por PCR. AZ: control colonia azul (casete gen *lacZ*); pUPD2: control positivo plásmido pUPD2; LB: control negativo medio Luria Bertuni; H<sub>2</sub>O: control negativo agua.

A partir de las piezas básicas se fueron obteniendo construcciones genéticas cada vez más complejas mediante la estrategia de ensamblaje descrita en la Figura 3. Tal y como se indica, las secuencias codificantes (FB254, FB255, FB256 y FB294) fueron combinadas con las secuencias promotora y terminadora del casete de expresión *afpa* de *P. expansum*, recientemente adaptado a la metodología FB por el grupo de investigación. Finalmente, cada una de las tres unidades transcripcionales resultantes (FB267, FB268 y FB277) se combinaron con el casete de resistencia a geneticina (FB009) para permitir la selección durante la transformación fúngica.

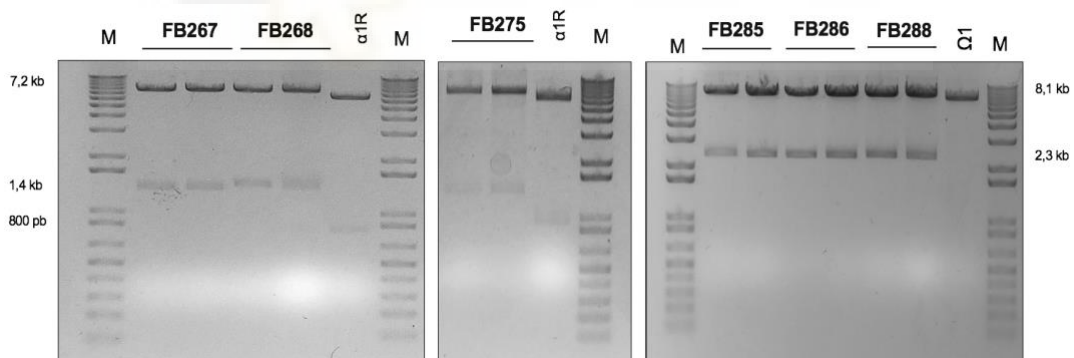


**Figura 3. Esquema de generación de las unidades transcripcionales para las proteínas quiméricas.** Las piezas básicas fueron combinadas con el promotor y terminador del casete FB *afpa* mediante una reacción de digestión-ligación (Nivel 1). Cada una de las unidades transcripcionales resultantes fueron combinadas mediante una reacción de digestión-ligación con el marcador de resistencia de geneticina (FB009) para la selección de transformantes en *P. chrysogenum* (Nivel 2).

Las vectores recombinantes generados en los ensamblajes de Nivel 1 y 2 fueron confirmadas mediante PCR colonia con oligonucleótidos flanqueantes a las unidades transcripcionales y mediante comparación del patrón de bandas asociado al análisis de restricción con endonucleasas de doble corte (Figuras 4-5).



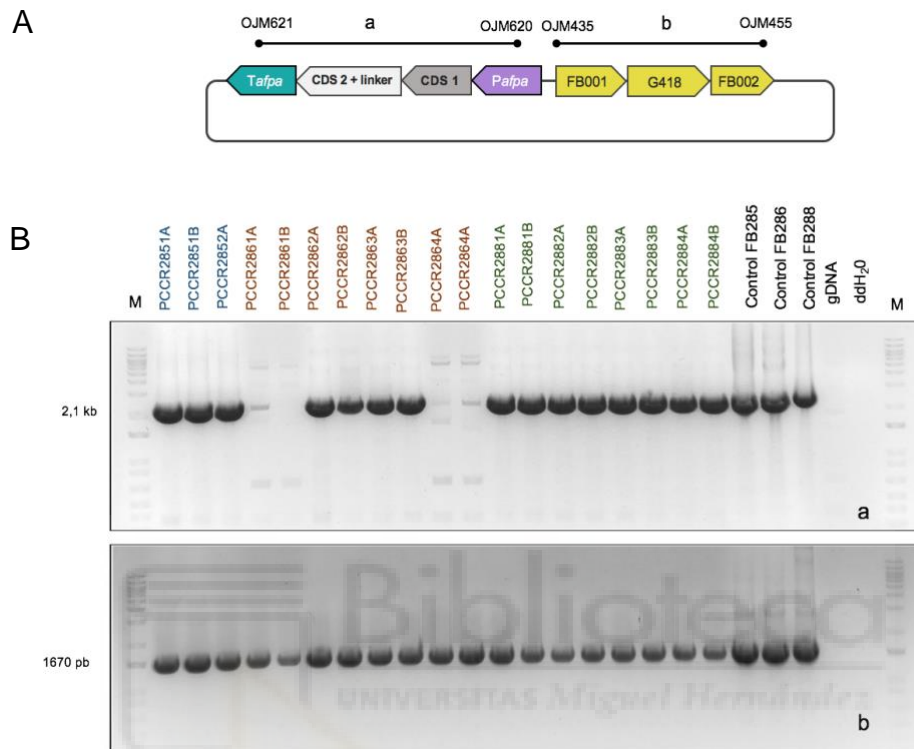
**Figura 4. Verificación de las colonias individuales correspondientes a los ensamblajes FB en gel de agarosa 1% (w/v).** (A) Amplificación por PCR colonia de las unidades transcripcionales de Nivel 1 y (B) ensamblajes multipartitos de Nivel 2. M: marcador de pesos moleculares; AZ: control colonia azul (casete gen *lacZ*); LB: control negativo de medio Luria Bertuni; H<sub>2</sub>O: control negativo de agua;  $\alpha$ 1R: control positivo plásmido pDGB $\alpha$ 1R;  $\Omega$ 1: control positivo plásmido pDGB $\Omega$ 1.



**Figura 5. Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias individuales en gel de agarosa 1% (w/v).** Patrón de restricción de las construcciones FB267, FB286 y FB275 (Nivel 1) y FB285, FB286 y FB288 (Nivel 2) con BanII. M: marcador de pesos moleculares;  $\alpha$ 1R: control del patrón restricción del plásmido receptor pDGB $\alpha$ 1R;  $\Omega$ 1: control del patrón restricción del plásmido receptor pDGB $\Omega$ 1.

Los vectores binarios resultantes de la estrategia de clonaje (FB286, FB286 y FB288) fueron utilizados directamente en la transformación de *P. chrysogenum* mediada por *A. tumefaciens* (ATMT).

Los transformantes monospóricos obtenidos tras el proceso de transformación fueron confirmados molecularmente utilizando dos parejas de oligonucleótidos seleccionadas para cubrir la longitud completa de las construcciones multigénicas, tal y como queda representado en la Figura 6A.



**Figura 6. Confirmación molecular de los transformantes monospóricos para FB285, FB286 y FB288.** (A) Esquema de las reacciones de amplificación y puntos de anillamiento (B) Amplificación por PCR para identificar los transformantes positivos para FB285 (azul), FB286 (marrón) y FB288 (verde). gDNA: DNA genómico de la cepa parental *P. chrysogenum*  $\Delta$ paf. ddH<sub>2</sub>O: control negativo agua destilada.

La Figura 6B muestra la evaluación de 19 de los transformantes resistentes a geneticina seleccionados para su confirmación. En total se identificaron 13, 11 y 16 transformantes positivos para la construcción FB285 (PeAfpA::PeAfpA), FB286 (PeAfpA::Sca) y FB288 (Sca::PeAfpA), respectivamente. Además, en cuatro de los transformantes evaluados para la construcción FB286 se observó la ausencia de amplicón en la región correspondiente al casete de expresión de la proteína quimérica (Figura 6B, superior), lo que puede estar relacionado con fenómenos de integración ectópica aberrantes.

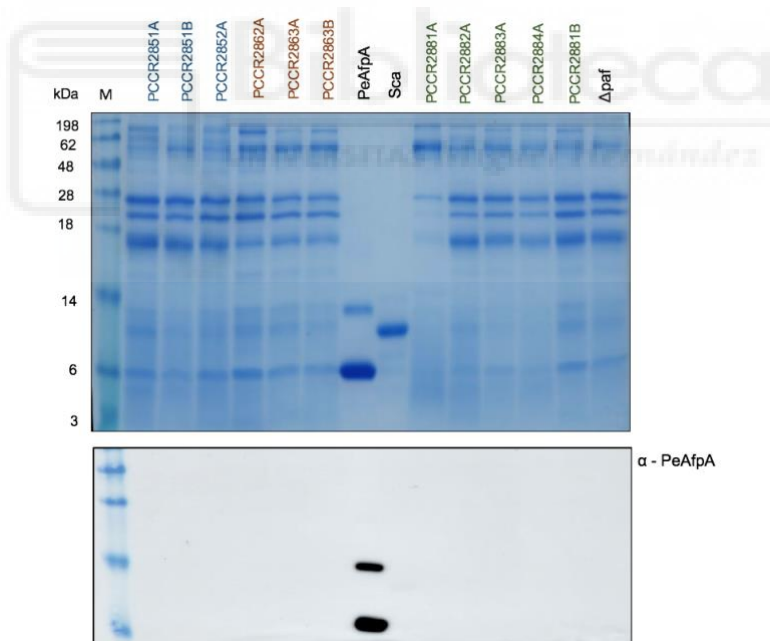


### 4.3. Evaluación de la capacidad de producción de las proteínas quiméricas

Los transformantes confirmados molecularmente fueron cultivados en medio mínimo PcMM para evaluar la capacidad de producción de las proteínas quiméricas. La Figura 7 constituye un ejemplo representativo de gel SDS-PAGE resultante de las muestras de sobrenadantes 10X de once de los transformantes evaluados tras 5 días de crecimiento.

Las proteínas diseñadas biotecnológicamente presentan un masa molecular teórica de 14,3 kDa para PeAfpA::PeAfpA y de 19,7 kDa para las combinaciones con Sca, con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 9,48 y 8,98, respectivamente.

En ninguno de los transformantes FB285 se detectó banda proteica de elevada intensidad correspondiente al tamaño molecular esperable del dímero PeAfpA (14,3 kDa). De igual modo, ninguna de las cepas transformadas con las construcciones FB286 (AfpA::Sca) o FB288 (Sca::AfpA) fue capaz de producir una banda proteica del peso molecular estimado (19,7 kDa) en cantidades detectables (Fig 7, panel superior).



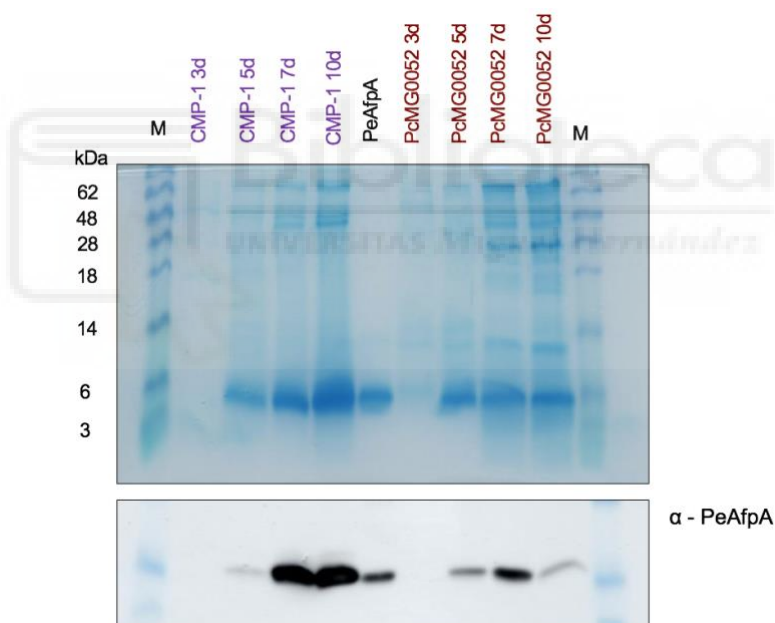
**Figura 7. Análisis de los sobrenadantes de cultivo de las cepas transformantes mediante SDS-PAGE.** Tinción azul coomassie de los sobrenadantes 10X tras 5 días de crecimiento (panel superior) y western blot para la detección de PeAfpA (panel inferior). Se cargaron 2  $\mu$ g de PeAfpA y Sca puras como controles. M: SeeBlue Pre-stained protein standard.

La incapacidad de los transformantes de producir las proteínas quiméricas bajo las condiciones evaluadas en este trabajo fue confirmada mediante inmunodetección con el anticuerpo

policlonal anti-PeAfpA (Fig 7, panel inferior). En concordancia, las proteínas quiméricas tampoco fueron detectadas en los sobrenadantes líquidos de los transformantes crecidos durante 3 días (datos no mostrados), por lo que su ausencia a día 5 no parece corresponderse con fenómenos de degradación proteica.

#### 4.4. Optimización de las condiciones de producción de PeAfpA en el sobreproductor PcMG0052 de *P. chrysogenum*

Trabajos previos realizados por el grupo de investigación han permitido generar una cepa sobreproductora (PcMG0052) de la proteína antifúngica PeAfpA en *P. chrysogenum* a través del casete de expresión *afpa* de FB. Con el objetivo de optimizar las condiciones de producción de PeAfpA en el sobreproductor se procedió a evaluar la secreción de la proteína en los sobrenadantes de cultivo líquido tras 3, 5, 7 y 10 días de crecimiento en matraz con medio mínimo PcMM (Figura 8).



**Figura 8. Análisis Western blot de los sobrenadantes de *P. expansum* CMP-1 y la cepa sobreproductora *P. chrysogenum* PcMG0052 a lo largo del tiempo.** Gel SDS-PAGE 16% de los sobrenadantes 5X tras 3, 5, 7 y 10 días de crecimiento en PcMM (panel superior) y western blot para la detección de PeAfpA (panel inferior). Se cargó 1  $\mu$ g de proteína pura PeAfpA como control. M: SeeBlue Pre-stained protein standard.

Para la cepa silvestre *P. expansum* CMP-1, productor natural de PeAfpA, se detectó una banda proteica del peso molecular esperado (~6 kDa) desde el día 5, alcanzando una intensidad creciente hasta el día 10. En cambio, en el transformante PcMG0052 se detectó una banda

proteica del peso molecular estimado desde el día 5, manteniendo una intensidad similar a lo largo de los tiempos evaluados. Sin embargo, a partir del día 7 se identificaron además indicios de degradación proteica, lo que podría estar relacionado con fenómenos de proteólisis que pueden estar afectando a la estabilidad de la proteína PeAfpA madura.

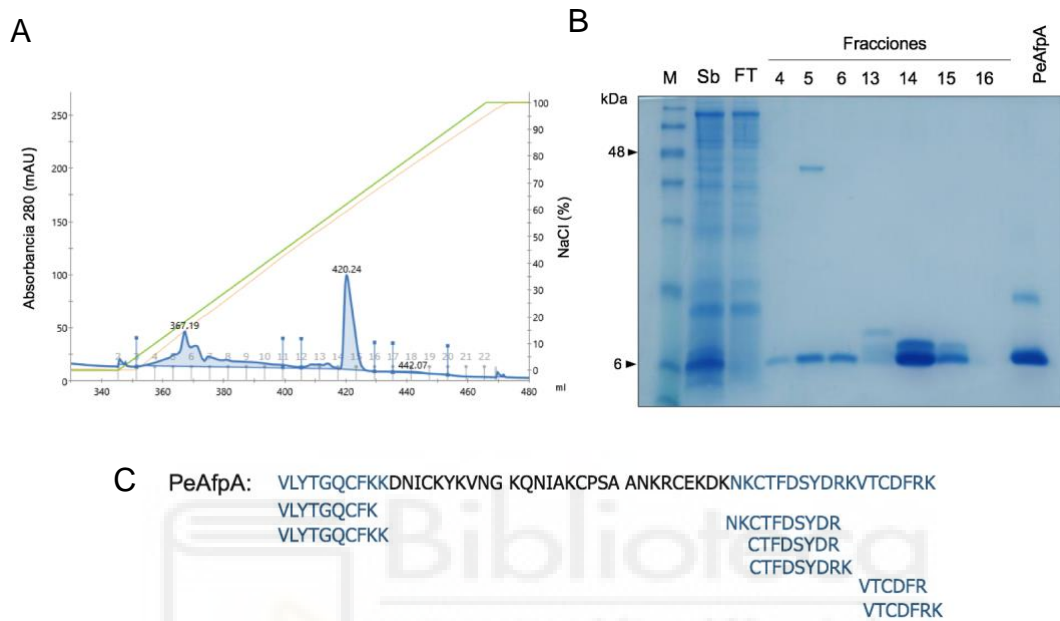
La detección inmunoquímica de PeAfpA confirmó una producción superior de PeAfpA a tiempos largos (7 y 10 días) en la cepa CMP-1 de *P. expansum*. Por su parte, en el transformante PcMG0052 de *P. chrysogenum* la mayor producción se alcanzó en el día 7, con una densidad de banda un 50% inferior a la alcanzada por CMP-1 a día 11. Asimismo, la comparación densitométrica a tiempos cortos (3 y 5 días) resaltó la ausencia de la proteína a día 3 y la presencia de densidades de banda similares a día 5 en ambas cepas, siendo ligeramente superior en PcMG0052.

Dado que PeAfpA parece ser secretada por PcMG0052 en cantidades similares a CMP-1 a tiempos cortos, se procedió a comparar el rendimiento de purificación de la proteína a partir de los sobrenadantes de cultivo tras 5 días de incubación. En concordancia con las propiedades fisicoquímicas de PeAfpA ( $pI = 9,48$ ), la proteína madura secretada por *P. expansum* fue purificada con éxito mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH 6,5, identificando un único pico de elución correspondiente a la proteína de interés. En cambio, durante la purificación de PeAfpA secretada por la cepa PcMG0052 se identificaron dos picos de elución independientes, correspondientes a las fracciones 4-7 y 14-15 (Figura 9A). La evaluación de estas fracciones cromatográficas en gel SDS-PAGE mostró la coelución de dos bandas de distinto peso molecular ( $\sim 38$  y  $6$  kDa) en la fracción 5 y dos bandas de peso molecular similar ( $\sim 6$  kDa) en las fracciones 14-15 (Figura 9B).

Se procedió a la identificación de las proteínas coeluidas en las fracciones 5 y 14 mediante determinación de la huella peptídica a partir de las bandas recortadas del gel de poliacrilamida. Las dos bandas detectadas en la fracción 5 correspondían con una arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa de *P. chrysogenum* (hit score 505; E-value  $1,1e^{-45}$ ) de 36 kDa y con la proteína antifúngica PAFC de *P. chrysogenum* (hit score 184; E-value  $1,4e^{-13}$ ), para la que se ha determinado un peso molecular de 6,6 kDa en su forma madura (Holzknecht *et al.*, 2020). Por su parte, las bandas de las fracciones 14 correspondían con la proteína madura PeAfpA de *P. expansum* (hit score 144; E-value  $1,1e^{-12}$ ) de 6,6 kDa y con la proteína antifúngica PAFB de *P. chrysogenum* (hit score 143; E-value  $1,7 e^{-09}$ ) de 6,5 kDa (Huber *et al.*, 2018).

El orden de elución identificado en el cromatograma es concordante con el punto isoelectrico teórico de cada proteína, eluyendo en primera instancia las proteínas con un  $pI$  más próximo a

6,5 (pl teórico de 6,19 y 7,71 para la endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa y PAFC, respectivamente). En contraposición, la migración electroforética observada en el gel SDS-PAGE 16% para las proteínas antifúngicas PAFB, PAFC y PeAfpA difiere levemente del patrón de migración esperable en base a su peso molecular, lo que es debido a su elevada carga positiva como proteínas catiónicas.



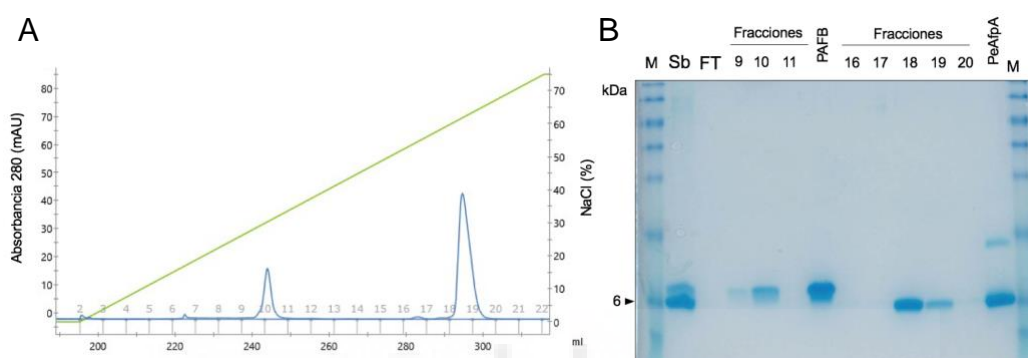
**Figura 9. Purificación e identificación de PeAfpA secretada por el sobreproductor PcMG0052.** (A) Cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de PeAfpA, se muestra la absorbancia a 280 nm (azul) y el gradiente de NaCl (línea verde) (B) Gel SDS-PAGE 16% de las fracciones cromatográficas. Sb: sobrenadante crudo; FT: flow-through; M: SeeBlue Pre-stained protein standard. Se cargó 1  $\mu$ g de proteína pura PeAfpA como control. (C) Identificación por huella peptídica de PeAfpA (banda inferior de la fracción 14) expresada heterológamente con el casete *afpa* en el transformante PcMG0052.

Trabajos previos han descrito casos en los que se producen modificaciones de la secuencia madura de las AFPs como consecuencia de truncamientos parciales en su extremo N-terminal durante su procesamiento post-traduccion (Garrigues *et al.*, 2017; Huber *et al.*, 2018). En este trabajo, el análisis por huella peptídica ha permitido verificar el correcto procesamiento y secreción de la proteína PeAfpA producida por el sobreproductor PcMG0052 de *P. chrysogenum*, sin identificarse la pérdida o adición de aminoácidos extra con respecto a la secuencia de la proteína PeAfpA madura de *P. expansum* (Figura 9C).

Dado que PeAfpA y PAFB presentaban un mismo patrón de elución, se evaluó la capacidad de separar ambas proteínas mediante modificación de las condiciones cromatográficas iniciales. Las

proteínas PeAfpA y PAFB presentan un  $pI$  teórico de 9,48 y 8,83, respectivamente. Dada su diferencia en  $pI$ , la realización de la cromatografía de intercambio catiónico en tampón Tris HCl pH 8 y gradiente de elución en NaCl 0-0,3M permitió separar ambas proteínas en dos picos cromatográficos independientes, correspondientes a la proteína PAFB y PeAfpA, respectivamente (Figura 10).

El rendimiento total obtenido de PeAfpA y PAFB puras tras las dos cromatografías fue de 4,8 y 5,3 mg/L, respectivamente. Por su parte, el rendimiento de purificación de PeAfpA a partir del cultivo de CMP-1 fue 4,2 mg/L, similar al obtenido con la cepa sobreproductora PcMG0052.



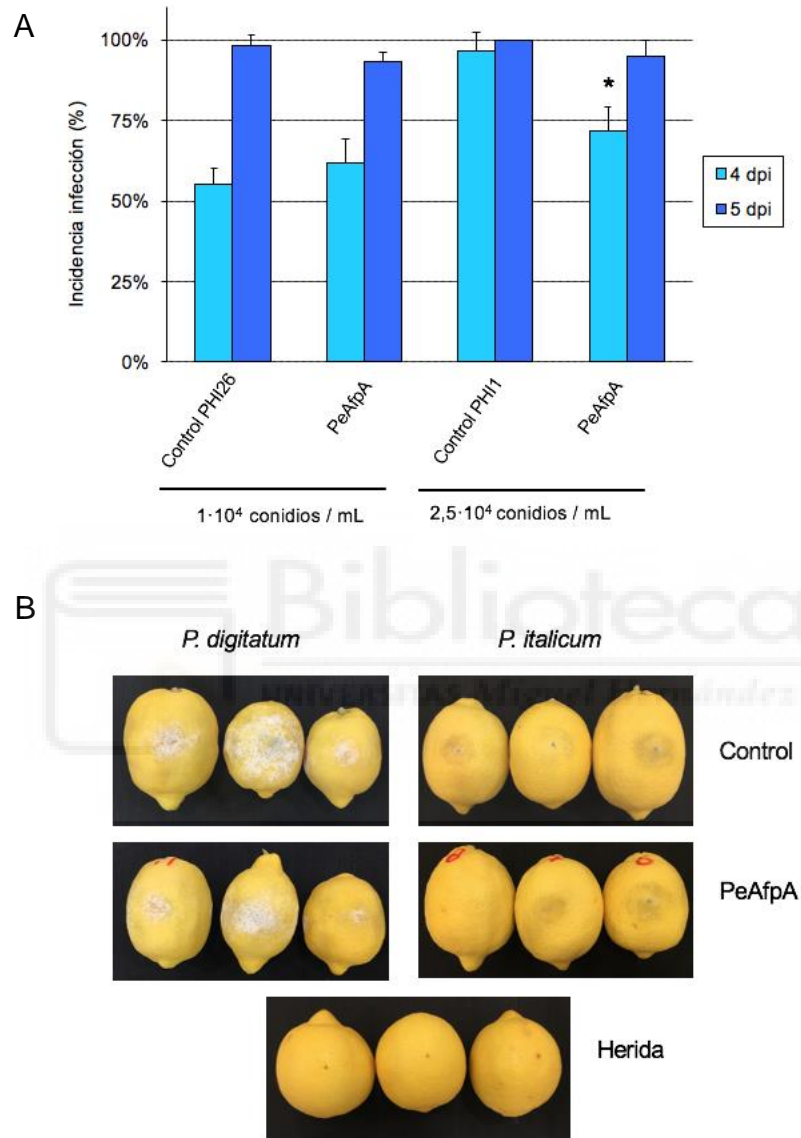
**Figura 10. Repurificación de PeAfpA y PAFB.** (A) Cromatograma de la purificación en columna de intercambio catiónico a pH 8, en donde se muestra la absorbancia a 280 nm (azul) y el gradiente de NaCl (línea verde). (B) Gel SDS-PAGE 16% de las fracciones correspondientes a los picos cromatográficos. Sb: sobrenadante crudo; FT: flow-through; M: SeeBlue Pre-stained protein standard. Se cargaron 2  $\mu$ g de proteína pura de PeAfpA y PAFB como controles de la migración.

#### 4.5. Efecto protector de PeAfpA en limones frente a *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*

La proteína PeAfpA ha demostrado presentar un efecto protector frente a la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en naranjas cv. Navel (Garrigues *et al.*, 2018). Basándonos en estos resultados, se procedió a optimizar las condiciones de inoculación requeridas para evaluar el efecto de PeAfpA frente a *P. digitatum* y *P. italicum* en el control postcosecha de frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burn) variedad 'Primafori'.

Se realizó un primer ensayo de infección con el que determinar el efecto protector asociado a la aplicación de 100  $\mu$ g/mL de PeAfpA (15  $\mu$ M) frente al crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum* a una concentración de  $1 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL, respectivamente. En este caso, PeAfpA no provocó una reducción de la incidencia de la infección de *P. digitatum* tras 4 y

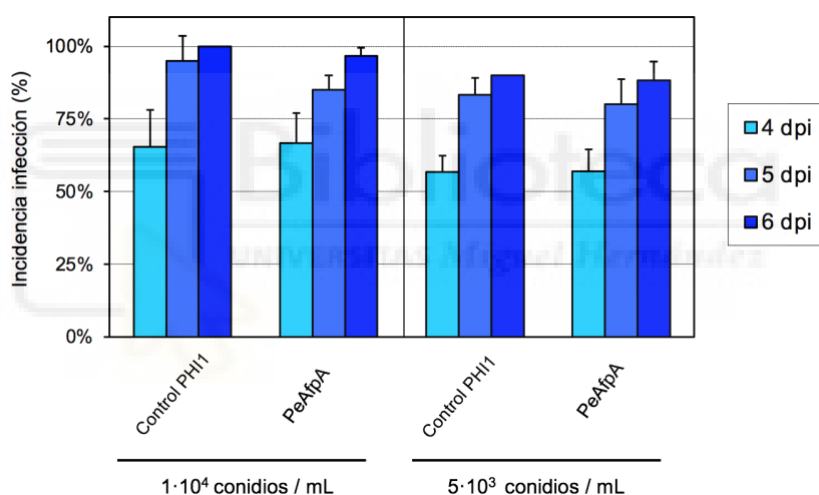
5 dpi. En cambio, el tratamiento con PeAfpA sí mostró una disminución significativa del porcentaje de heridas infectadas por *P. italicum* a 4 dpi, con una reducción media del 25% respecto a los limones no tratados con PeAfpA. Sin embargo, esta protección se perdía a 5 dpi (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de PeAfpA sobre la infección de limones con *P. digitatum* (PHI26) y *P. italicum* (PHI1).** (A) Efecto de PeAfpA (15  $\mu$ M) sobre la infección de limones variedad 'Primafori'. Las barras representan la media de heridas infectadas junto a la desviación típica para tres réplicas de cinco limones a día 4 y 5 post-infección (dpi). El asterisco indica la existencia de diferencias significativas en la incidencia de la infección del tratamiento comparado con el control para cada dpi (test t-student, \* $p < 0,05$ ). (B) Imagen representativa de los distintos tratamientos a 4 dpi.

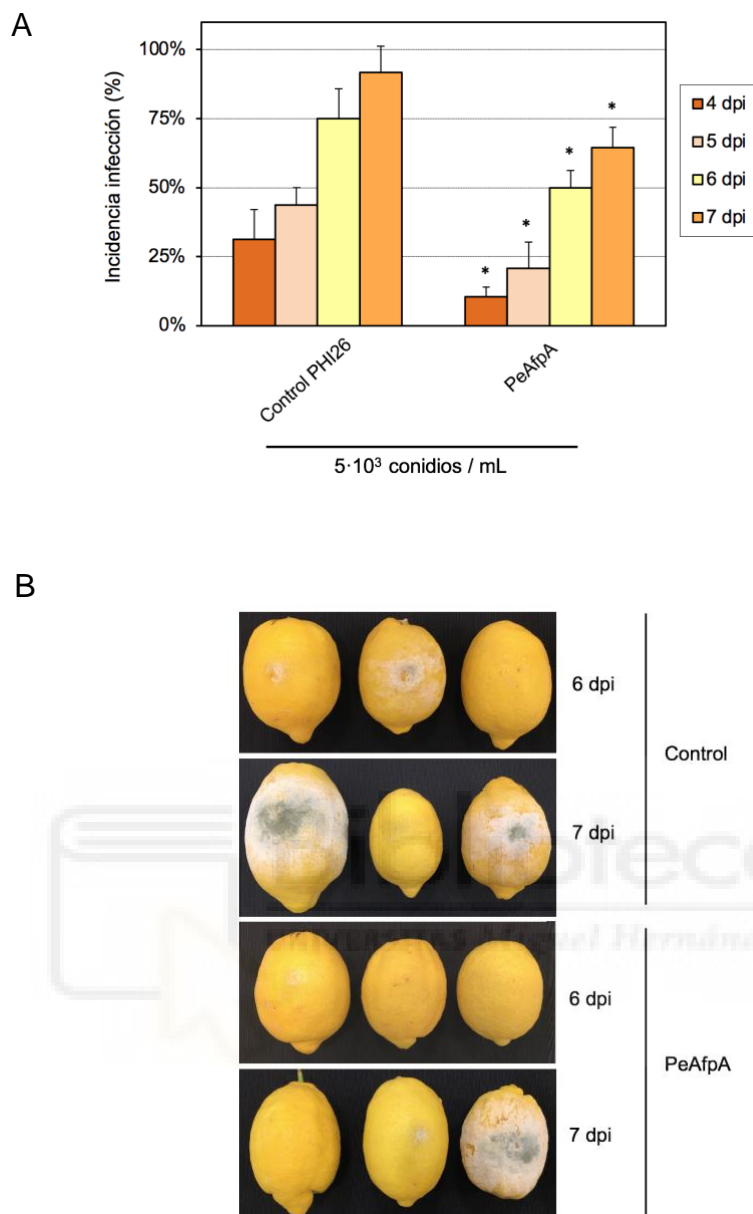
En este primer ensayo, las dosis de inóculos aplicadas generaron una infección prácticamente completa (100%) en los limones control no tratados con PeAfpA a 5 dpi, alcanzándose una incidencia media del 97% a tan solo 4 dpi en el caso de *P. italicum*. Por tanto, la elevada dosis de inóculo aplicada resalta la agresividad de las condiciones de ensayo testadas, lo que impedía evaluar la eficacia de PeAfpA a consecuencia de la rápida progresión de la infección fúngica.

Con el objetivo de optimizar las condiciones de inoculación, se realizó un segundo ensayo con *P. italicum* en el que se redujo la dosis de inóculo inicial a  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^3$  conidios/mL. La disminución de la concentración de conidios redujo el porcentaje medio de infección de los limones control hasta el 65 y 57% a 4 dpi, respectivamente, permitiendo evaluar la progresión de la infección a 4, 5 y 6 dpi. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el primer ensayo, no se detectaron diferencias significativas asociado a la aplicación de PeAfpA (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de PeAfpA sobre la infección de limones con *P. italicum* (PHI1).** Las barras representan la media del porcentaje total de heridas infectadas y su desviación típica para tres réplicas de cinco limones a día 4, 5 y 6 post-infección (dpi). No se detectaron diferencias significativas en la incidencia media de la infección de cada tratamiento respecto a cada control (test t-student,  $p < 0,05$ ).

Finalmente, se evaluó la reducción de la concentración de inóculo inicial de *P. digitatum* hasta  $5 \times 10^3$  conidios/mL. El tratamiento con  $15 \mu\text{M}$  de PeAfpA generó una reducción significativa de la incidencia de la infección tras 4 dpi, manteniéndose este efecto a lo largo del ensayo (día 5, 6 y 7). A día 7, la incidencia media alcanzada fue del 64,58% en los limones tratados con PeAfpA, un 27% inferior al grupo control (Figura 13).



**Figura 13. Efecto de PeAfpA sobre la infección de limones con *P. digitatum* (PHI26).** (A) Efecto de PeAfpA (15  $\mu$ M) sobre la infección de limones variedad ‘Primafiori’ inoculados con *P. digitatum*. Las barras representan la media de porcentaje total de heridas infectadas y su desviación típica para tres réplicas de cuatro limones a día 4, 5, 6 y 7 post-infección (dpi). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en la incidencia de la infección de cada tratamiento comparado con el control para cada dpi (test t-student, \*p < 0,05). (B) Imágenes representativas de la infección producida por *P. digitatum* a 6 y 7 dpi en limones control (infección) y tratados con PeAfpA.



## 5. Discusión

El objetivo global de este trabajo ha sido evaluar distintas estrategias biotecnológicas con las que optimizar la producción de la proteína antifúngica PeAfpA en *P. chrysogenum*, hongo filamentoso de gran relevancia como biofactoría de metabolitos secundarios de interés comercial (Guzmán-Chávez *et al.*, 2018). Esta biofactoría, además, se ha mostrado exitosa en la producción homóloga y heteróloga de distintas AFPs (Garrigues *et al.*, 2018; Sonderegger *et al.*, 2016).

El diseño de proteínas quiméricas mediante estrategias biotecnológicas permite combinar distintos dominios proteicos que aporten nuevas funcionalidades a las proteínas, tal y como la mejora de su solubilidad, capacidad de plegamiento, actividad enzimática o propiedades farmacocinéticas (Son *et al.*, 2021). En este trabajo se ha evaluado el diseño de tres proteínas quiméricas basadas en la combinación dimérica de la proteína PeAfpA y en la fusión de PeAfpA con la proteína aniónica Sca de *P. digitatum*, cuyos elevados rendimientos de producción alcanzados con el casete *paf* permiten hipotetizar un uso potencial como “scaffold” para la mejora de la producción biotecnológica de proteínas (Garrigues *et al.*, 2020). La utilización del sistema de clonaje modular FungalBraid ha permitido la generación de un total de cuatro nuevas piezas básicas, tres unidades transcripcionales intermedias y tres construcciones multigénicas finales adaptadas al sistema de transformación ATMT de hongos filamentosos. Tanto el sistema FB como su análogo GB para plantas han sido caracterizados como sistemas de clonaje de elevada eficiencia (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013). En concordancia, en este estudio el 100% de las colonias evaluadas mediante PCR colonia y análisis de restricción contenían las construcciones correctas.

A pesar de la correcta generación y transformación de las construcciones multigénicas, ninguno de los transformantes evaluados para cada una de los dímeros fue capaz de producir una cantidad detectable de proteína en los sobrenadantes de cultivo. Además, es resaltable la baja eficiencia de transformación alcanzada mediante el método ATMT, con un número de colonias crecidas en medio de selección muy inferior a las transformaciones ejecutadas rutinariamente en el laboratorio con *P. chrysogenum* (datos no incluidos). Las bajas eficiencias de transformación y la incapacidad de detectar la producción de ninguna de las proteínas quiméricas podría estar relacionado con un potencial efecto tóxico asociado a la actividad antifúngica de las proteínas diseñadas, favoreciendo la selección en placa de los transformantes en donde se han producido eventos de inserción aberrantes y/o mutaciones que impiden su correcta expresión y secreción. Asimismo, cabe considerar la relevancia de la secuencia

espaciadora sobre la estructura terciaria de las proteínas diseñadas, dado que su selección puede influir directamente en la incorrecta agregación o plegamiento de los dominios proteicos (Zhang *et al.*, 2009). La estrategia seguida en este trabajo se basó en reproducir el espaciador identificado entre los dos dominios naturales de la defensina aniónica MtDef5, de estructura tridimensional similar a las AFPs (Islam *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos resaltan la importancia de considerar nuevas secuencias espaciadoras en base al modelado *in silico* de la estructura terciaria esperable para cada una de las proteínas quiméricas.

La generación de transformantes sobreproductores de AFPs constituye otra de las estrategias biotecnológicas con las que incrementar los rendimientos de producción de las AFPs. En este trabajo se ha evaluado la producción heteróloga de PeAfpA en el transformante PcMG0052 de *P. chrysogenum*  $\Delta paf$ , en donde se ha confirmado su correcta producción y secreción. La producción homóloga y heteróloga de AFPs en la cepa parental mutante  $\Delta paf$  tiene como objetivo evitar la co-expresión de la proteína antifúngica PAF, producida de forma natural en cantidades muy elevadas (Sonderegger *et al.*, 2016). Sorprendentemente, en este trabajo se identificó la secreción simultánea de las proteínas nativas PAFB y PAFC de *P. chrysogenum*, junto con la proteína de interés PeAfpA, a día 5 de incubación. Es de destacar que hasta el momento no se había identificado la producción natural de las proteínas PAFB y PAFC en la cepa  $\Delta paf$  junto con proteínas heterólogas bajo las condiciones usuales de cultivo. Recientemente, Holznecht *et al.* (2020) detectaron la presencia de PAFC en el sobrenadante de cultivo de la cepa nativa Q176 de *P. chrysogenum* tras 96 h de crecimiento en medio mínimo PcMM 1X. Sin embargo, la producción identificada era insuficiente para su purificación. Por otro lado, Huber *et al.* (2019) únicamente detectaron la inducción y producción de PAFB bajo condiciones de exceso de nutrientes (PcMM 4X) tras un mínimo de 48 h de cultivo.

A pesar de identificarse la coelución de PAFB y PeAfpA, ha sido posible separar ambas proteínas en base a su punto isoeléctrico, incrementando el pH (de 6,5 a 8) al que se realiza la cromatografía de intercambio catiónico. Por otro lado, la producción simultánea de hasta tres proteínas antifúngicas en los sobrenadantes del sobreproductor PcMG0052 permite considerar la posibilidad de abordar estrategias futuras basadas en la utilización de “cocktails” proteicos como agentes de biocontrol. Diversos ensayos *in vitro* de actividad antifúngica han mostrado la existencia de interacciones sinérgicas que mejoran la capacidad antimicrobiana de distintas AFPs (Gandía *et al.*, 2020). En contraposición, Gandía *et al.* (2021) no fueron capaces de detectar efecto sinérgico o aditivo al evaluar la combinación de PeAfpA y PAFB en el control de *P. digitatum* y *P. expansum* en frutos de naranja y manzana, respectivamente. En este sentido, la caracterización del modo de acción de la proteína PeAfpA y la determinación de los

mecanismos de interacción entre distintas AFPs jugará un papel clave a la hora de abordar este tipo de ensayos de combinación en trabajos futuros.

En lo que respecta a los rendimientos de purificación de PeAfpA, no se superaron los 5 mg/L para la producción heteróloga tras 5 días de cultivo. A pesar de alcanzarse un rendimiento similar al obtenido a día 5 con la cepa silvestre CMP-1, el rendimiento es altamente inferior al descrito con CMP-1 tras 10 días de incubación (125 mg/L) (Garrigues *et al.*, 2018). Es esperable que la ejecución de una única cromatografía bajo las condiciones optimizadas en este trabajo permita minimizar las pérdidas asociadas al proceso de purificación. Asimismo, será necesario evaluar el incremento del tiempo de incubación como mecanismo para mejorar los rendimientos de producción, siendo esperable una producción superior a día 7. Sin embargo, hay que destacar que *P. expansum*, productor natural de PeAfpA, es un hongo fitopatógeno y micotoxigénico, mientras que *P. chrysogenum*, biofactoría empleada en este trabajo para producir PeAfpA, ha sido tradicionalmente utilizada en la producción a gran escala de metabolitos secundarios de interés biomédico y agroalimentario.

Además de la optimización de los rendimientos de purificación, la futura aplicación de las AFPs en conservación postcosecha requiere de la demostración de su eficacia en ensayos *in vivo* de infección. En este trabajo se ha evaluado por primera vez el efecto de la proteína PeAfpA en la protección de limones frente a los dos principales hongos fitopatógenos de cítricos, *P. digitatum* y *P. italicum*, aunque los resultados obtenidos resaltan la existencia de variabilidad entre ensayos.

A pesar de que se haberse descrito una potente actividad antifúngica de PeAfpA frente a *P. italicum* en ensayos *in vitro* (MIC 2 µg/mL) (Garrigues *et al.*, 2018), en este trabajo no se detectó un efecto protector significativo y estable a lo largo de los dos ensayos efectuados en el patosistema *P. italicum* – limón. Estos resultados son coincidentes con los observados sobre naranjas var. Lanelate y Navel (Gandía *et al.*, 2021). Asimismo, la existencia de discrepancias entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* han sido descrito con otras AFPs, como PAFC o PdAfpB (Gandía *et al.*, 2021). Entre algunos de los factores implicados podría considerarse la presencia de sustratos específicos de los frutos que favorezcan el crecimiento fúngico o reduzca su susceptibilidad a las AFPs, así como la presencia de compuestos específicos de la piel de los cítricos que puedan interferir en la actividad de las AFPs.

En este trabajo se ha identificado un efecto protector leve de PeAfpA frente a la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en limones 'Primafiori', generando un retraso en la progresión de la infección observable cuando se aplica una concentración de inóculo inicial que permite

monitorizar la evolución de la infección a lo largo del experimento. A la hora de evaluar estos resultados debe tenerse en cuenta las condiciones de inoculación efectuadas. En este contexto, la inoculación aislada de PeAfpA en cada una de las heridas puede estar contribuyendo al crecimiento preferencial del micelio una vez alcanza las áreas colindantes a la herida, en donde la proteína está ausente. Por tanto, la confirmación de la viabilidad de PeAfpA como biofungicida requerirá de la ejecución de ensayos que reflejen las condiciones de aplicación comerciales, en donde los fungicidas son aplicados sobre la superficie completa de los frutos.

Finalmente, las variaciones detectadas en la progresión temporal de las infecciones fúngicas en los frutos de limón resaltan la relevancia de optimizar la concentración de inóculo inicial aplicada en los ensayos de protección *in vivo*. Además, ponen de manifiesto la dificultad asociada a la comparación de distintos ensayos de infección en función de los protocolos seguidos en cada caso, así como la variabilidad existente entre ensayos.



## 6. Conclusiones

- I. Se han diseñado y generado correctamente tres construcciones multigénicas para la bioproducción de proteínas quiméricas basadas en PeAfpA. Sin embargo, no se ha detectado la capacidad de producción de ninguna de las proteínas diseñadas biotecnológicamente en los transformantes de *P. chrysogenum*.
- II. La expresión heteróloga del gen de PeAfpA bajo el control de su propio promotor *afpa* ha permitido la correcta secreción y procesamiento de la proteína en *P. chrysogenum*.
- III. Se ha detectado por primera vez la producción simultánea de PAFB y PAFC en los sobrenadantes de cultivo del transformante PcMG0052 de *P. chrysogenum*, lo que podría permitir generar mezclas de proteínas antifúngicas.
- IV. Se han optimizado exitosamente las condiciones cromatográficas requeridas para la purificación de la proteína PeAfpA a partir de los sobrenadantes de cultivo de la cepa PcMG0052, separándola de la proteína antifúngica PAFB.
- V. PeAfpA no presenta efecto de protección frente a la infección de *P. italicum* sobre frutos de limón, a pesar de ser activa en experimentos de crecimiento *in vitro*.
- VI. PeAfpA presenta un efecto protector leve frente a la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en frutos de limón, generando un retraso de la progresión de la infección que deberá ser confirmado en trabajos posteriores.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Proteínas y Péptidos Bioactivos de interés agroalimentario del IATA como becaria del programa de becas JAE-intro 2020 de Introducción a la investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

## 8. Bibliografía

- Alshannaq, A., and Yu, J.H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Batta, G., Barna, T., Gáspári, Z., Sándor, S., Kövér, K.E., Binder, U., Sarg, B., Kaiserer, L., Chhillar, A.K., Eigentler, A., et al. (2009). Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF – a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J.* 276, 2875–2890. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07011.x>
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahamm, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., and Núñez, F. (2016). Antifungal proteins from moulds: analytical tools and potential application to dry-ripened foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6991–7000. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7706-2>
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., and Zacarías, L. (2011). 21 - Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, E.M.B.T.-P.B. and T. of T. and S.F. Yahia, ed. (Woodhead Publishing), pp. 437-516. <https://doi.org/10.1533/9780857092762.437>
- FAOSTAT statical database (2019). Food and agriculture data. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#home> a 27 de junio de 2021
- Galgóczy, L., Borics, A., Virágh, M., Ficze, H., Váradi, G., Kele, Z., and Marx, F. (2017). Structural determinants of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) for folding, stability and antifungal activity. *Sci. Rep.* 7, 1963. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02234-w>
- Gandía, M., Monge, A., Garrigues, S., Orozco, H., Giner-Llorca, M., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2020). Novel insights in the production, activity and protective effect of *Penicillium expansum* antifungal proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 3922–3931. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.208>
- Gandía, M., Kakar, A., Giner-Llorca, M., Holzknrecht, J., and Mart, P. (2021). Potential of Antifungal Proteins (AFPs) to Control *Penicillium* Postharvest Fruit Decay. 7(6), 449. <https://doi.org/10.3390/jof7060449>
- Garrigues, S., Gandía, M., and Marcos, J.F. (2016). Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2243–2256. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7110-3>
- Garrigues, S., Gandía, M., Popa, C., Borics, A., Marx, F., Coca, M., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2017). Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum*. *Sci. Rep.* 7, 1–13.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15277-w>

- Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2018). Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. *Front. Microbiol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02370>
- Garrigues, S., Marcos, J.F., Manzanares, P., and Gandía, M. (2020). A novel secreted cysteine-rich anionic (Sca) protein from the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* enhances virulence and modulates the activity of the Antifungal Protein B (AfpB). *J. Fungi* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3390/jof6040203>
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R.D., Bovenberg, R.A.L., and Driessen, A.J.M. (2018). Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Front. Microbiol.* 9, 2768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>
- Hegedüs, N., and Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.* 26, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002>
- Herederó, M., Garrigues, S., Gandía, M., Marcos, J., and Manzanares, P. (2018). Rational Design and Biotechnological Production of Novel AfpB-PAF26 Chimeric Antifungal Proteins. *Microorganisms* 6, 106. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040106>
- Hernanz-Koers, M., Gandía, M., Garrigues, S., Manzanares, P., Yenush, L., Orzaez, D., and Marcos, J.F. (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal Genet. Biol.* 116, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.04.010>
- Holmes, G.J., and Eckert, J.W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89, 716–721. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.716>
- Holzknécht, J., Kühbacher, A., Papp, C., Farkas, A., Váradi, G., Marcos, J.F., Manzanares, P., Tóth, G.K., Galgóczy, L., and Marx, F. (2020). The *Penicillium chrysogenum* Q176 antimicrobial protein pafc effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. *J. Fungi* 6, 1–21. <https://doi.org/10.3390/jof6030141>
- Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., Fizil, Á., Czajlik, A., Kele, Z., Sonderegger, C., et al. (2018). New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A Cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. *Sci. Rep.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20002-2>
- Huber, A., Lerchster, H., and Marx, F. (2019). Nutrient excess triggers the expression of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAFB. *Microorganisms* 7, 15–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120654>
- Islam, K.T., Velivelli, S.L.S., Berg, R.H., Oakley, B., and Shah, D.M. (2017). A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. *Sci. Rep.* 7, 16157. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>
- López-García, B., Moreno, A.B., San Segundo, B., De los Ríos, V., Manning, J.M., Gavilanes, J.G., and Martínez-del-Pozo, A. (2010). Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 70, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.11.002>
- Marcos, J.F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., and López-García, B. (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 273–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121307.094843>

- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., and Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martínez-Culebras, P. V., Gandía, M., Boronat, A., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2021). Differential susceptibility of mycotoxin-producing fungi to distinct antifungal proteins (AFPs). *Food Microbiol.* 97, 103760. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103760>
- Marx, F., Haas, H., Reindl, M., Stöffler, G., Lottspeich, F., and 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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00701-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00701-6)
- Meyer, V. (2008). A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 17–28. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1291-3>
- Michael Zasloff (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Palou, L. (2014). Chapter 2 - *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). S.B.T.-P.D. Bautista-Baños, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 45–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8>
- Papoutsis, K., Mathioudakis, M.M., Hasperué, J.H., and Ziogas, V. (2019). Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends Food Sci. Technol.* 86, 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>
- Sánchez-Torres, P., and Tuset, J.J. (2011). Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.017>
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., and Orzaez, D. (2013). GoldenBraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol.* 162, 1618–1631. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217661>
- Son, B., Kong, M., Lee, Y., and Ryu, S. (2021). Development of a Novel Chimeric Endolysin, Lys109 With Enhanced Lytic Activity Against *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 11, 3490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.615887>
- Sonderegger, C., Galgóczy, L., Garrigues, S., Fizil, Á., Borics, A., Manzanares, P., Hegedüs, N., Huber, A., Marcos, J.F., Batta, G., et al. (2016). A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb. Cell Fact.* 15, 192. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0586-4>
- Sonderegger, C., Váradi, G., Galgóczy, L., Kocsubé, S., Posch, W., Borics, A., Dubrac, S., Tóth, G.K., Wilflingseder, D., and Marx, F. (2018). The evolutionary conserved  $\gamma$ -core motif influences the anti-Candida activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Front. Microbiol.* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01655>
- Tuset, J.J. (1987). Podredumbres de Los Frutos Cítricos. *General. Valencia. España Cons. d'Agricultura i Pesca.* 95–98.
- Vazquez-Vilar, M., Gandía, M., García-Carpintero, V., Marqués, E., Sarrion-Perdigones, A., Yenush, L., Polaina, J., Manzanares, P., Marcos, J.F., and Orzaez, D. (2020). Multigene Engineering by GoldenBraid Cloning: From Plants to Filamentous Fungi and Beyond.



*Curr. Protoc. Mol. Biol.* 130, 1–31. <https://doi.org/10.1002/cpmb.116>

Zhang, J., Yun, J., Shang, Z., Zhang, X., and Pan, B. (2009). Design and optimization of a linker for fusion protein construction. *Prog. Nat. Sci.* 19, 1197–1200. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.12.007>

