

Sandra Garrigues, Mónica Gandía y Jose F. Marcos

Departamento de Ciencia de los Alimentos. Grupo de Fisiología, Patología y Biotecnología Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) - CSIC. Avenida Agustín Escardino 7. 46980 Paterna. Valencia. España.

1

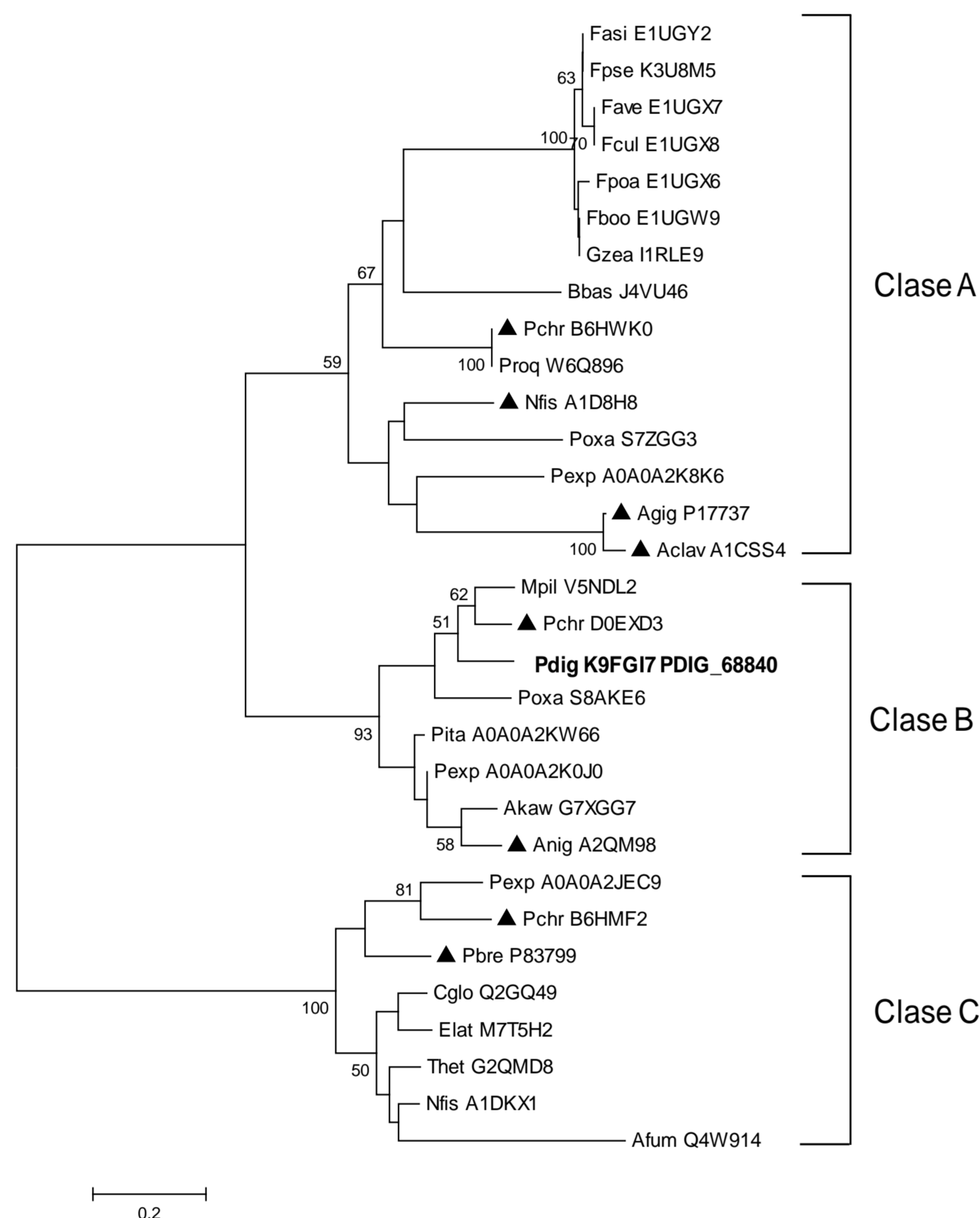
Los péptidos o pequeñas proteínas antimicrobianas (AMPs) están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su pequeño tamaño posibilita su síntesis química y diseño racional para mejorar sus propiedades antimicrobianas. Se ha propuesto su utilización en protección vegetal para el control de enfermedades causadas por patógenos.

Los cítricos son el cultivo de árbol frutal más importante a nivel mundial y particularmente a nivel nacional. Uno de los principales problemas de nuestra citricultura son las pérdidas causadas por las podredumbres postcosecha, entre las que destacan las producidas por el hongo *Penicillium digitatum*. Su principal método de control es el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, la aplicación de fungicidas presenta inconvenientes derivados de su toxicidad, limitado espectro de acción y aparición de resistencias. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el control de estas fitopatologías. Las proteínas antifúngicas (AFPs) son un grupo específico de AMPs producidas por hongos filamentosos. Son proteínas pequeñas (<10 kDa), catiónicas, ricas en residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro, muy estables y que se secretan abundantemente al medio. Las AFPs inhiben el crecimiento de hongos no productores y otros hongos relacionados, sin presentar toxicidad inespecífica. La función natural de estas AFPs en la biología del hongo productor y el mecanismo de autoinmunidad frente a su acción antifúngica son prácticamente desconocidos.

2

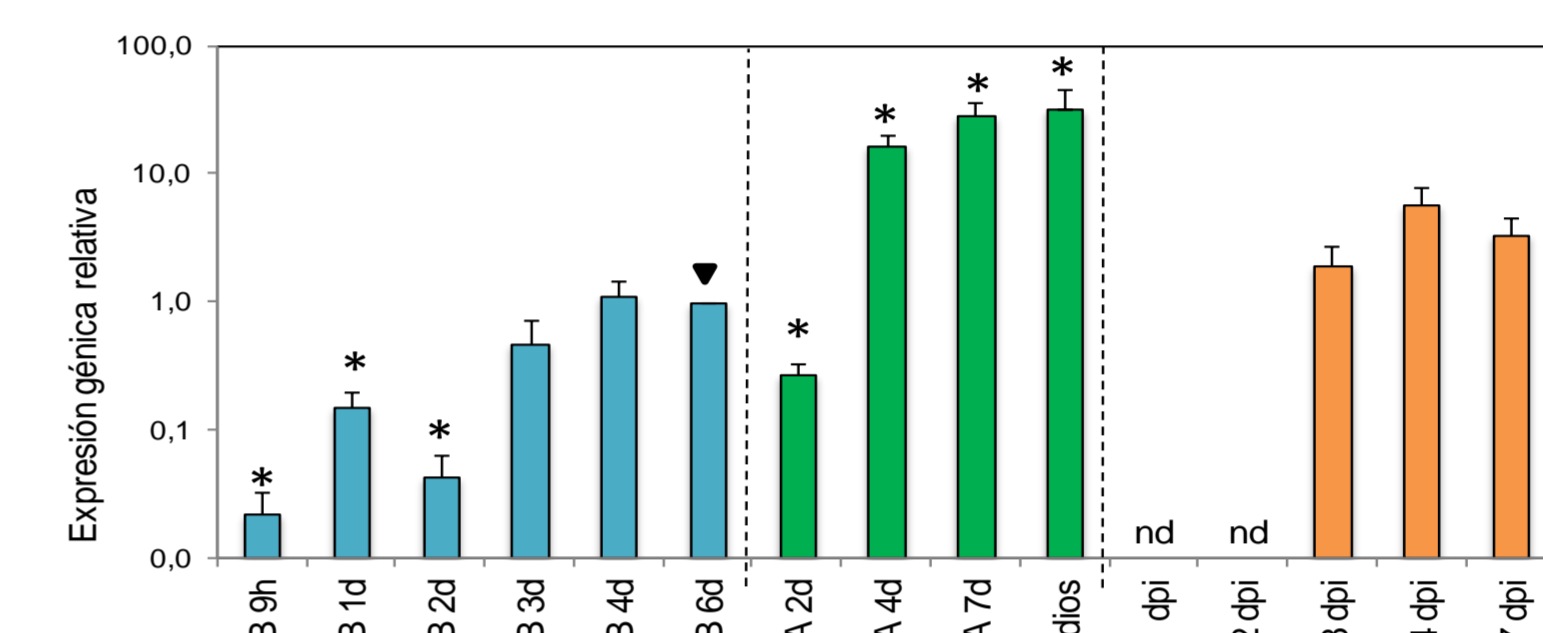
La secuenciación del genoma de *P. digitatum* (CECT20796, AKCT01000000) ha revelado la existencia de genes que podrían codificar pequeñas proteínas ricas en cisteína del tipo AFP. De ellos, se ha seleccionado para este estudio el gen PDIG_68840, al que denominaremos *afpB*. Este gen codificaría una proteína que compartiría un 91% de identidad con la proteína PgAFP (D0EXD3) recientemente descrita en *Penicillium chrysogenum*, lo cual apoyaría su anotación como AFP.

Nuestros análisis filogenéticos han revelado la existencia de tres clases de AFPs en las cuales se agrupan proteínas con actividad antifúngica demostrada (▲). La proteína **PDIG_68840** se agruparía con otras AFPs de otros hongos filamentosos, en la clase B.



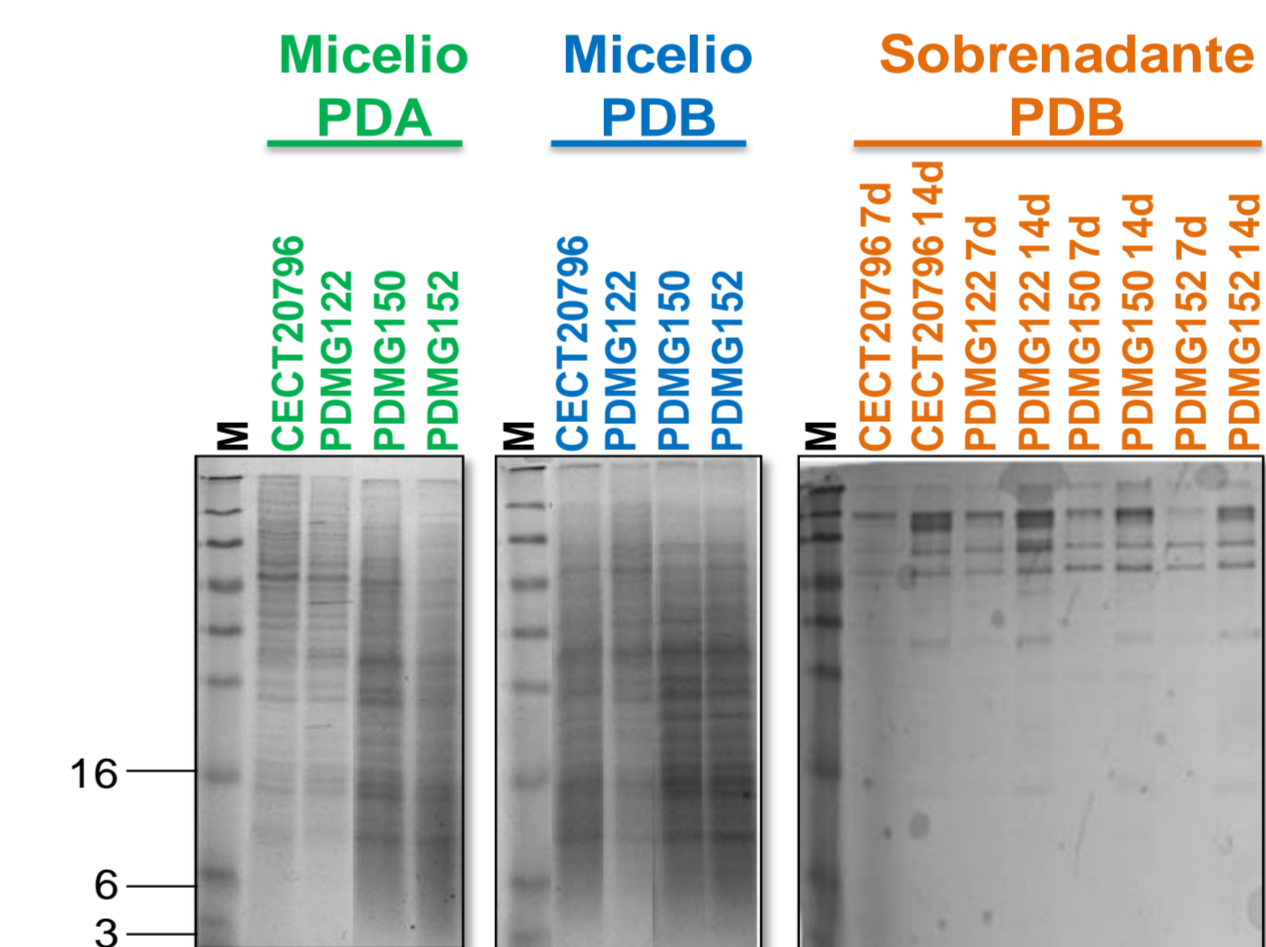
3

Los análisis de expresión génica mediante qRT-PCR del gen *afpB* revelan una gran inducción de su expresión en medio de cultivo líquido (PDB) a tiempos tardíos, coincidiendo con lo descrito para otras AFPs. Adicionalmente se observa su expresión durante la infección sobre frutos cítricos, característica previamente no descrita para este tipo de proteínas. Sin embargo, la mayor inducción de su expresión la encontramos en medio de cultivo sólido (PDA), alcanzando el mayor valor de la inducción de su expresión en conidios.



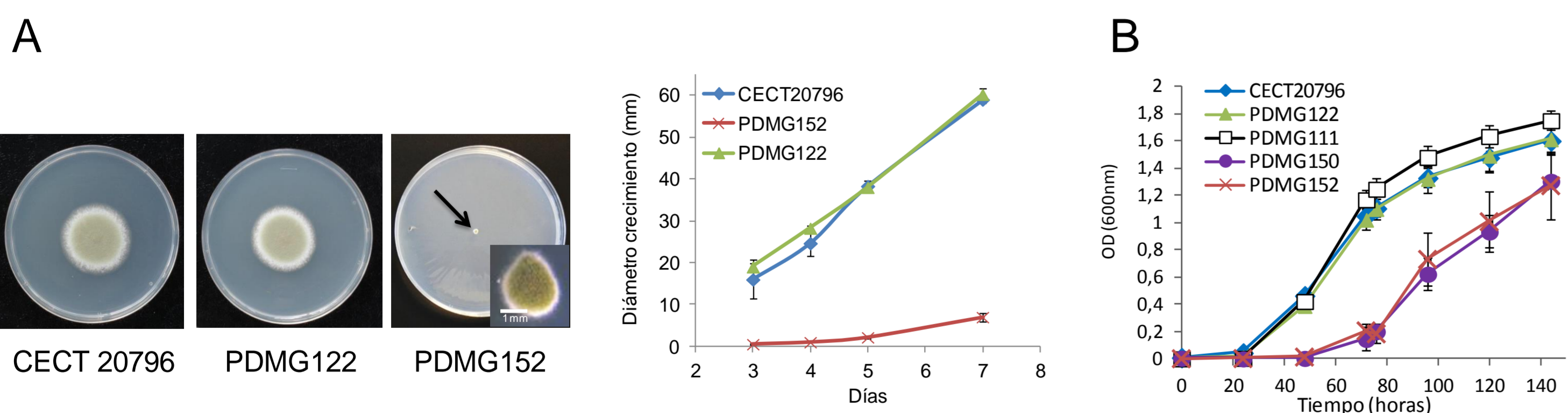
5

Se compararon los patrones de proteínas obtenidas a partir de extractos de micelio en PDA (verde) y PDB (azul) de la cepa parental CECT20796, del mutante nulo PDMG122 y de las cepas de expresión constitutiva PDMG150 y PDMG152 con los patrones obtenidos a partir del sobrenadante del medio de cultivo PDB de las mismas cepas a diferentes días (d) de incubación (naranja). Sorprendentemente no se observó ninguna banda de bajo peso molecular diferencial (≈6 kDa) entre las cepas mutantes y la parental, por lo que la proteína PDIG_68840 no pudo detectarse mediante SDS-PAGE a pesar de la inducción de su expresión en estas condiciones.

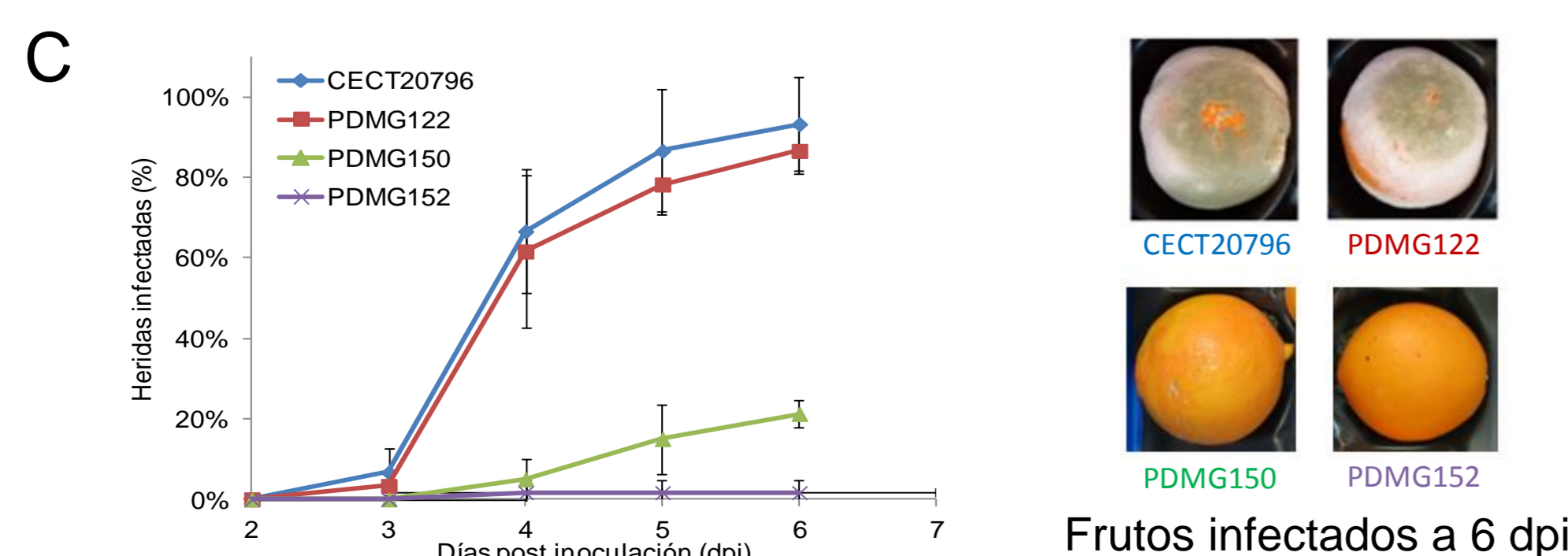


4

Para determinar la función biológica del gen *afpB* en *P. digitatum*, se llevó a cabo su eliminación por recombinación homóloga mediante transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Adicionalmente se obtuvieron mutantes de expresión constitutiva transformando con el gen *afpB* bajo el control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. Los mutantes nulos (p.ej., PDMG122) no presentaron diferencias con respecto a la cepa parental CECT20796 en cuanto al crecimiento en medio de cultivo sólido PDA (A). Los mutantes constitutivos (PDMG150 y PDMG152) mostraron un crecimiento reducido tanto en medio de cultivo sólido (A) como medio líquido (B).



Al contrario que los mutantes nulos, los mutantes constitutivos presentaron diferencias durante la infección experimental sobre frutos de naranja (C), habiéndose reducido significativamente su capacidad infectiva y virulencia. Los resultados indican que el gen *afpB* es prescindible para el desarrollo e infección de *P. digitatum* en las condiciones ensayadas, mientras que su expresión constitutiva disminuye la capacidad de crecimiento y de infección del hongo. Este resultado es consistente con la toxicidad antifúngica de una proteína AFP codificada por el gen *afpB*.



6

Se diseñaron y sintetizaron cuatro péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos de PDIG_68840 de forma que mapearan la secuencia de la proteína prácticamente en su totalidad (A). La actividad inhibitoria de estos péptidos fue testada sobre *P. digitatum* CECT20796.

Los péptidos catiónicos PAF112, derivado del lazo más grande y expuesto de la proteína, y PAF118 mostraron actividad inhibitoria frente a la cepa parental (B). El péptido PAF109, que contiene el motivo gamma (γ) conservado en las AFPs, no mostró actividad inhibitoria en las condiciones ensayadas, por lo que se propone para este motivo una función estructural en PDIG_68840. Adicionalmente se comprobó la existencia de una interacción sinérgica positiva (ANOVA, p<0,05) entre los péptidos PAF112 y el hexapéptido PAF26 desarrollado en nuestro laboratorio, lo que podría indicar mecanismos de acción diferenciales entre ambos (C).

